



Departamento de Bioquímica

Ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales en modelos celulares de salud y enfermedad

Tesis Doctoral

David Moreno Lastres

Madrid 2014

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica

David Moreno Lastres

para optar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

**ENSAMBLAJE DE LOS SUPEROCMPLEJOS
MITOCONDRIALES EN MODELOS
CELULARES DE SALUD Y ENFERMEDAD**

Directores de tesis:

Cristina Ugalde Bilbao

Miguel Ángel Martín Casanueva

Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Doña **Cristina Ugalde Bilbao**, Doctora en Ciencias, como Directora de Tesis y
Don **Miguel Ángel Martín Casanueva**, Doctor en Farmacia, como Co-Director de
Tesis,

CERTIFICAN:

Que Don David Moreno Lastres, con DNI 47225535-A, licenciado en
Bioquímica, ha realizado bajo nuestra dirección en el Instituto de Investigación Hospital
12 de Octubre (i+12) de Madrid, el trabajo titulado:

**ENSAMBLAJE DE LOS SUPERCOMPLEJOS
MITOCONDRIALES EN MODELOS CELULARES DE SALUD Y
ENFERMEDAD**

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos
necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral
con el objeto de optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad
Autónoma de Madrid.

Madrid, a 2 de Junio de 2014

**Dr. Ricardo Escalante
Hernández**
(Tutor)
Instituto de Investigaciones
Biomédicas
"Alberto Sols"
C/ Arturo Duperier, 4
28029 Madrid

**Dra. Cristina Ugalde
Bilbao**
(Directora de Tesis)
Instituto de Investigación
Hospital Universitario 12
de Octubre.
Avenida de Córdoba s/n
28041 Madrid

**Dr. Miguel Ángel
Casanueva**
(co-Director de Tesis)
Instituto de Investigación
Hospital Universitario 12
de Octubre.
Avenida de Córdoba s/n
28041 Madrid

.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de Formación en Investigación en Salud (PFIS) (expediente número FI09/00320) por parte del Instituto de Salud Carlos, asignado a Don David Moreno Lastres. El presente trabajo ha sido financiado por un proyecto de investigación del Instituto de Salud Carlos III (número PI05-0647), concedido a la Dra. Cristina Ugalde Bilbao, así como por un proyecto de la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (número 2005-069), concedido al Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva.

A mis padres y Javi

“Si te vieres rodeado de mucha gente ignorante, no te envanezcas por lo que sabes, más bien mira a los que te superan en conocimientos y verás que aún no eres lo que te imaginas ser; y estás por debajo de muchos”

Mahoma

"En este lugar perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás, camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas, se curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos."

Walt Disney

AGRADECIMIENTOS

Todo empezó desde bien pequeño cuando pasaba los veranos con mi abuela en la parcela. Yo tendría unos diez años cuando con ese afán de saber y contestar a la maravillosa pregunta de: “¿Y qué ocurre si...?”, se me ocurrió la brillante idea de mezclar lejía y amoníaco, menos mal que estaba al aire libre y pude salir corriendo, imaginarnos la situación. A lo largo de mi vida esa y muchas otras experiencias me han servido para aprender que en general las cosas no se pueden hacer a lo loco, sino que necesitan de una meditación y análisis previo para poder realizarlas de la forma más correcta posible, aunque algunas veces uno siga equivocándose.

Cuatro años dan para cruzarse a mucha gente durante el camino. Mucha de esa gente me ha prestado su ayuda y apoyo ya bien sea de forma directa o indirecta para poder realizar este trabajo. Agradezco eternamente a todas y cada una de estas personas porque sin su dedicación y paciencia conmigo yo no hubiera llegado al punto donde estoy ahora.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis directores de tesis, el Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva y la Dra. Cristina Ugalde Bilbao, por haber confiado en mí cuando era un estudiante de Master y haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de “mitocondriólogos” del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre.

Agradecerle a la Dra. Aurora Sánchez Pacheco y a la Dra. Marina Lasa Benito por haberme introducido en el mundo de la investigación durante mi último año como estudiante de Bioquímica en la Universidad Autónoma de Madrid y por haber aguantado mis meteduras de pata en ese mundo nuevo del laboratorio que era para mí.

Al laboratorio de diagnóstico, especialmente a las técnicas Sara, Laura y Pilar (mi bruji) y a dos fantásticos investigadores Alberto Blázquez y Aitor, los cuales me han ayudado en todo momento que lo he necesitado y porque sin su trabajo diario mucha gente estaría en una situación peor ¡¡¡¡ Gracias de verdad!!!! A la Dra. María Moran que tan comprensiva y paciente ha sido con mis mil y una preguntas. A mi compañera de batalla en el Blue Native la Dra. Inés García-Consuegra con la que tan buenos momentos he pasado y tanto me he reído y compartido en esas horas de comida. También agradecerles a Paco y Alberto García su ayuda y apoyo incondicional cuando se lo he pedido.

A mi compañera Paz, que ha sabido valorarme como compañero y apoyarme en los momentos bajos, no cambies nunca porque ese buen fondo que tienes lo tiene poca gente. Aunque nuestro encuentro en el laboratorio ha sido corto, también agradecer a mi compañera Teresa a la que le doy el testigo del Blue native, por esos momentos aunque breves pero intensos, me llevo una buena amiga. A mis compañeros Rafa y Albert el burgalés, que aunque también corto nuestro encuentro, me demostraron ser personas de confianza.

A la gente del centro de investigación especialmente a Noelia, Sara porfirias, Ana, María, Regina, Alicia, Vanesa, Manu, Desiré, Rocío, Laura, y Juan Carlos por vuestro apoyo y ayuda y por esa fiesta en las comidas de Navidad que nunca olvidaré. Agradecer en los últimos años al grupo de Hematología su ayuda en el nuevo laboratorio y en especial a Carolina de Inmunología, una buena compañera de charletas. No quiero olvidarme de Marta, mi compañera de andaduras, que ha estado conmigo desde mis inicios en Biología en Alcalá y Bioquímica en la Autónoma y con la que he vivido muchísimas cosas y aunque la distancia durante estos años no nos ha permitido vernos todo lo que quisiéramos te he tenido muy presente.

A mis Padres, Ana y Julio, que gracias a ellos y con su ejemplo de estos últimos años he aprendido a superar las adversidades de la vida y saber mirar el lado positivo de las cosas para lidiar con aquellos que en algún momento han querido ponerme la zancadilla. Espero que estéis conmigo muchiiiiiiisimos años para poder disfrutar de vuestra compañía y consejos, y poder seguir aprendiendo de vosotros cada día, os quiero. Por último, GRACIAS a ti Javi, por tu paciencia y comprensión en mis días malos y porque has sabido sacarme una sonrisa cuando la necesitaba. Quién sabe dónde acabaremos, pero espero que siempre juntos. Te quiero.

Muchísimas gracias a todos.

RESUMEN / SUMMARY

Los modelos de organización de la cadena respiratoria o sistema OXPHOS en la membrana interna mitocondrial ha sido objeto de un intenso debate. Actualmente se acepta que los complejos de la cadena respiratoria se encuentran formando estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos o respirasomas. Dichas estructuras generan una interdependencia estructural entre los diferentes complejos, con importantes implicaciones para el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales ya que algunos defectos combinados pueden ser atribuidos a defectos genéticos de un solo complejo. Se han realizado estudios acerca de su estructura, composición y su implicación en diferentes patologías. Sin embargo, la mayoría de los aspectos relacionados con la regulación de la biosíntesis de los supercomplejos y su significado funcional aún queda por ser determinados. Además, aun no queda claro si determinadas estructuras como los supercomplejos I+III₂ y III₂+IV_n constituyen intermediarios de ensamblaje o productos de degradación de los supercomplejos. Para abordar estas cuestiones y estudiar la ruta de biosíntesis de los supercomplejo de cadena respiratoria, se utilizó la doxiciclina como inhibidor reversible de la traducción mitocondrial en tres líneas celulares control humanas (143B206, HEK293 y control de cíbridos transmitocondrial) y en tres líneas de cíbridos transmitocondriales que portaban mutaciones homoplásmicas en la subunidad ND2 del complejo I (m.4681T>C), en la subunidad citocromo b del complejo III (m.15533A>G) y en la subunidad COX2 del complejo IV (m.7896G>A). Posteriormente mediante BN-PAGE se analizaron las cinéticas de incorporación de las diferentes subunidades OXPHOS en los complejos individuales y supercomplejos. A partir de estos resultados proponemos el primer modelo de ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales donde la formación del respirasoma o supercomplejo I+III₂+IV_n se origina a partir del intermediario de ~830 kDa del complejo I, al cual se incorporan subcomplejos o subunidades libres del complejo III y el módulo NADH deshidrogenasa del complejo I para formar el supercomplejo I+III₂ totalmente ensamblado y activo. Posteriormente, el proceso terminaría con la incorporación de las subunidades COX del complejo IV al supercomplejo I+III₂ para formar el respirasoma mitocondrial o supercomplejo I+III₂+IV_n. Además proponemos que la biosíntesis de las formas intermedias de supercomplejos, como son el supercomplejo III₂+IV y el I+III₂, ocurre de forma independiente a la formación del supercomplejo I+III₂+IV_n.

The organization models of respiratory complexes or OXPHOS system in the inner membrane has been an object of intense debate. It is widely accepted that mitochondrial respiratory chain complexes are integrated in higher supramolecular structures called supercomplexes or respirasomas ($I+III_2+IV_n$). Such structures originate an interdependence between the individual OXPHOS complexes, with major implications for the diagnostics of mitochondrial disorders since some combined deficiencies can be attributed to the genetic defect of a single complex. However, most aspects regarding the biosynthetic regulation of supercomplexes and their functional significance remain to be determined. Furthermore, although it is unclear whether certain structures like supercomplexes $I+III_2$ and III_2+IV_n constitute intermediate structures or supercomplex degradation products. To address this issue and investigate the biosynthetic pathway of the respiratory chain supercomplexes, we used the doxycycline-induced reversible inhibition of mitochondrial translation in three different human control cell lines (143B206, HEK293 y transmitochondrial control cybrid) and in three mutant cybrids harboring homoplasmic mutations in the subunit ND1 of complex I (m.4681T>C), the subunit cytochrome b of complex III (m.15533A>G) and the subunit COX2 of complex IV (m.7896G>A). We subsequently investigated by BN-PAGE the time-course incorporation of OXPHOS subunits into individual complexes and supercomplexes. From these results, we propose the first assembly model of mitochondrial supercomplexes where the formation of respirasoma or supercomplex $I+III_2+IV_n$ is originated from ~ 830 kDa intermediate complex I, which free subunits or subcomplexes complex III and the NADH dehydrogenase module of complex I are incorporated to form the fully and active supercomplex $I+III_2$. Subsequently, the process would end with the addition of the COX subunits of complex IV into the supercomplex $I+III_2$ to form the respirasoma mitochondrial or supercomplex $I+III_2+IV_n$. Further, we propose that the biosynthesis of the intermediate forms of supercomplexes, such as the supercomplexes III_2+IV and $I+III_2$, is independent of the formation of the supercomplex $I+III_2+IV_n$.

ÍNDICE

| | |
|--|--------|
| RESUMEN / SUMMARY | - 15 - |
| ÍNDICE | - 21 - |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | - 27 - |
| ABREVIATURAS | - 31 - |
| INTRODUCCIÓN | - 37 - |
| 1 La mitocondria: estructura, morfología y funciones. | - 39 - |
| 2 Genoma mitocondrial | - 39 - |
| 3 Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) | - 40 - |
| 4 Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial | - 42 - |
| 4.1 Complejo I | - 42 - |
| 4.1.1 Estructura y composición | - 42 - |
| 4.1.2 Ensamblaje del complejo I | - 43 - |
| 4.2 Complejo II | - 45 - |
| 4.2.1 Estructura y composición | - 45 - |
| 4.2.2 Ensamblaje del complejo II | - 45 - |
| 4.3 Complejo III | - 46 - |
| 4.3.1 Estructura y composición | - 46 - |
| 4.3.2 Ensamblaje del complejo III | - 46 - |
| 4.4 Complejo IV | - 47 - |
| 4.4.1 Estructura y composición | - 47 - |
| 4.4.2 Ensamblaje del complejo IV | - 48 - |
| 5 Modelos de organización de la cadena respiratoria mitocondrial | - 49 - |
| 6 Supercomplejos mitocondriales | - 51 - |
| 6.1 Composición | - 51 - |
| 6.2 Estructura | - 52 - |
| 6.3 Funciones de los supercomplejos | - 54 - |
| 6.3.1 Aumento de la eficiencia del flujo de electrones y de la canalización de sustratos | - 54 - |
| 6.3.2 Disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno | - 55 - |
| 6.3.3 Estabilidad y ensamblaje | - 56 - |
| 6.4 Ensamblaje de los supercomplejos | - 57 - |
| 6.5 Factores de ensamblaje de los supercomplejos | - 58 - |
| MATERIALES Y MÉTODOS | - 59 - |
| 1 Pacientes y controles | - 61 - |
| 2 Reactivos, soluciones y tampones | - 61 - |

| | | |
|------|---|------|
| 3 | Mantenimiento de los cultivos celulares..... | 61 - |
| 4 | Cíbridos transmitocondriales | 62 - |
| 5 | Ensayos de doxiciclina..... | 63 - |
| 6 | Cuantificación del número de copias del ADNmt | 64 - |
| 7 | Marcaje metabólico <i>in vitro</i> de proteínas de traducción mitocondrial..... | 65 - |
| 8 | Cuantificación de proteínas..... | 66 - |
| 9 | Preparación de lisados celulares para separación de proteínas en geles SDS-PAGE ... | 66 - |
| 10 | Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 66 - |
| 11 | Ensayos de electroforesis azul nativa (<i>Blue Native Electrophoresis, BN-PAGE</i>) | 67 - |
| 11.1 | Obtención de <i>pellets</i> mitocondriales a partir de cíbridos mediante tratamiento con digitonina..... | 67 - |
| 11.2 | Preparación de muestras para ensayos de electroforesis azul nativa (BNE-PAGE) | 67 - |
| 11.3 | Electroforesis bidimensional azul nativa..... | 68 - |
| 11.4 | Ensayos de actividad en gel (<i>IGA: In Gel Activity Assay</i>) | 70 - |
| 12 | Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección directa (<i>Western-blot</i>) | 70 - |
| 13 | Anticuerpos | 71 - |
| 14 | Medidas espectrofotométricas de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial..... | 72 - |
| | RESULTADOS | 75 - |
| 1. | ENSAMBLAJE DE LOS SUPERCOMPLEJOS MITOCONDRIALES EN MODELOS CELULARES CONTROL | 77 - |
| 1.1 | Distribución de las subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial en complejos y supercomplejos. | 77 - |
| 1.2 | Efectos del tratamiento con doxiciclina sobre los niveles de ADNmt y la traducción mitocondrial..... | 80 - |
| 1.3 | Efecto del tratamiento con doxiciclina sobre el ensamblaje de los complejos y supercomplejos de cadena respiratoria. | 82 - |
| 1.4 | Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo I en los supercomplejos mitocondriales. | 84 - |
| 1.5 | Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo III en los supercomplejos mitocondriales. | 87 - |
| 1.6 | Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo IV en los supercomplejos mitocondriales. | 89 - |
| 1.7 | Análisis comparativo de las cinéticas de ensamblaje de distintas subunidades OXPHOS en el respirasoma mitocondrial..... | 91 - |

| | | |
|------------|---|----------------|
| 1.8 | Incorporación del módulo NADH-deshidrogenasa en los supercomplejos de células control humanas. | - 94 - |
| 2 | ENSAMBLAJE DE LOS SUPERCOMPLEJOS MITOCONDRIALES EN CÍBRIDOS PORTADORES DE MUTACIONES HOMOPLÁSMICAS EN SUBUNIDADES DE LA CADENA RESPIRATORIA..... | - 97 - |
| 2.1 | Características de los cíbridos mutantes..... | - 97 - |
| 2.2 | Análisis en cíbridos mutantes en el gen <i>MT-ND2</i>..... | - 98 - |
| 2.2.1 | Niveles estacionarios de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en <i>MT-ND2</i> | - 98 - |
| 2.2.2 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo I en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en el gen <i>MT-ND2</i> | - 100 - |
| 2.2.3 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo III en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en <i>MT-ND2</i> | - 102 - |
| 2.2.4 | Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo IV en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en <i>MT-ND2</i> | - 104 - |
| 2.2.5 | Formación del respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en <i>MT-ND2</i> . - | 107 - |
| 2.3 | Análisis en cíbridos mutantes en el gen <i>MT-CYB</i>..... | - 109 - |
| 2.3.1 | Niveles estacionarios de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en <i>MT-CYB</i> | - 109 - |
| 2.3.2 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo I en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en <i>MT-CYB</i> | - 111 - |
| 2.3.3 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo III en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en <i>MT-CYB</i> | - 113 - |
| 2.3.4 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo IV en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en <i>MT-CYB</i> | - 115 - |
| 2.3.5 | Formación del respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en <i>MT-CYB</i> . - | 118 - |
| 2.4 | Análisis en cíbridos mutantes en el gen <i>MT-CO2</i>. | - 120 - |
| 2.4.1 | Niveles estacionarios de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en <i>MT-CO2</i> | - 120 - |
| 2.4.2 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo I en el supercomplejo I+III ₂ de cíbridos mutantes en <i>MT-CO2</i> | - 123 - |
| 2.4.3 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo III en el supercomplejo I+III ₂ de cíbridos mutantes en <i>MT-CO2</i> | - 125 - |
| 2.4.4 | Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo IV en el supercomplejo I+III ₂ de cíbridos mutantes en <i>MT-CO2</i> | - 128 - |
| 2.4.5 | Formación del respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en <i>MT-CO2</i> . - | 128 - |
| | DISCUSIÓN..... | - 131 - |
| | CONCLUSIONES | - 149 - |
| | BIBLIOGRAFÍA | - 153 - |
| | ANEXOS..... | - 183 - |

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial se pueden detectar como estructuras libres o bien asociados entre si formando macroestructuras conocidas como supercomplejos o respirasoma necesarios para la modulación de la actividad y estabilidad de los complejos individuales. Existen dos modelos hipotéticos acerca de la ruta de biogénesis de los supercomplejos. Por un lado, como primera hipótesis se ha postulado que es necesario el ensamblaje previo de cada uno de los complejos individuales de la cadena de transporte electrónico, para su posterior asociación y formación de los supercomplejos. Esta hipótesis se basa en la observación de que existe un lapso de tiempo entre la detección de los complejos individuales completamente ensamblados y la aparición de supercomplejos. Sin embargo, otros hallazgos sugieren que el ensamblaje de los supercomplejos ocurre a partir de la asociación de subcomplejos o complejos parcialmente ensamblados, dado que determinadas mutaciones que afectan al ensamblaje de los complejos libres no impiden la formación de supercomplejos parcialmente ensamblados. A fin de entender las interrelaciones estructurales existentes entre los diferentes complejos de la cadena respiratoria, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Analizar la composición de los supercomplejos en células humanas control y en concreto confirmar la presencia de complejo II en estas estructuras.

2. Determinar la ruta de ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales en distintas líneas celulares humanas control comunmente utilizadas en el laboratorio mediante inhibición reversible de la traducción mitocondrial en combinación con blue native electrophoresis (BNE) y *Western-blot*, utilizando una batería de anticuerpos que reconocen subunidades de los complejos del sistema OXPHOS. De esta forma se determinará cómo se produce en el tiempo la incorporación de subunidades en cada uno de los complejos OXPHOS individuales, así como en la estructura de los supercomplejos.

3. Analizar el efecto de mutaciones en subunidades mitocondriales del sistema OXPHOS sobre la biogénesis de los complejos y supercomplejos de cadena respiratoria. Ello nos permitirá definir los pasos intermedios en la biogénesis de los supercomplejos, así como mejorar la comprensión de las interdependencias estructurales entre los complejos del sistema OXPHOS.

ABREVIATURAS

143B Células 143B206 de osteosarcoma

1D-BN-PAGE Primera dimensión en condiciones nativas de la electroforesis azul nativa

2D-BN/SDS-PAGE Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNg ADN genómico

ADNmt ADN mitocondrial

ADNn ADN nuclear

ADP Adenosín difostato

ARN Ácido ribonucleico

ARNm ARN mensajero

ARNr ARN ribosómico

ARNt ARN de transferencia

ATP Adenosín trifosfato

b_H Centro b de alto potencial de transferencia de electrones del complejo III

b_L Centro b de bajo potencial de transferencia de electrones del complejo III

BN-PAGE Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (*Blue-Native*)

C Control

CC1 control de cíbridos 1

CI Complejo I, NADH deshidrogenasa

CII Complejo II, Succinato deshidrogenasa

CIII Complejo III, Ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa

CIV Complejo IV, Citocromo c oxidasa, COX

CoQ Coenzima Q10 o ubiquinona

COX Citocromo c oxidasa

CRM Cadena respiratoria mitocondrial

CS Citrato sintasa

CuA Centro binuclear de cobre A, grupo prostético de COX2

CuB Centro binuclear de cobre B, grupo prostético de COX2

CYC1 Citocromo c1

CYTB Citocromo b

CV Complejo V, H⁺ ATP sintasa

CYTC Citocromo c
DAB 3,3'-diaminobenzidina
DIG Digitonina
DMEM Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO Dimetil sulfóxido
DOX Doxíciclina
 Δp Gradiente electroquímico de protones
EDTA Ácido etilendiaminotetracético
EIM Espacio intermembrana
FAD Flavín adenín dinucleótido, oxidado
FADH₂ Flavín adenín dinucleótido, reducido
FBS Suero fetal bovino
Fe-S Grupo sulfoférico
HSP Promotor de la cadena psada (*Heavy strand promoter*)
IGA Ensayo de actividad en gel (*In gel activity*)
kDa KiloDalton
LDAO Óxido lauril-dimetilamina (*lauryldimethylamine N-oxide*)
LSP Promotor de la cadena ligera (*Light strand promoter*)
M Mutante
MEM Membrana externa mitocondrial
MIM Membrana interna mitocondrial
NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleótido, oxidado
NADH Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido
NTB Azul de nitrotetrazolio
O_H Origen de replicación de la cadena pesada
O_L Origen de replicación de la cadena ligera
OXPHOS Fosforilación oxidativa
(p/v) Masa de soluto (g) / volumen de disolución (ml) x 100
PBS Tampón fosfato salino
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
PSA Persulfato de amonio
Q Ubiquinona
QH₂ Ubiquinol
RMN Resonancia magnética nuclear

ROS Especies reactivas del oxígeno

SAM Complejo SAM (*Sorting and Assembly Machinery*)

SC Supercomplejos

SCa Actividad de los complejos I y IV en los supercomplejos

SDH Succinato deshidrogenasa

SDS Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS

SOD Superóxido dismutasa

SQR Succinato:ubiquinona oxidoreductasa

SS Estado estacionario

TEMED N, N, N'', N''-tetrametiletilendiamina

TIM Translocasa de membrana mitocondrial interna (*Translocase of the Inner Membrane*)

TOM Translocasa de membrana mitocondrial externa (*Translocase of the Outer Membrane*)

u.a.d unidades arbitrarias de densitometría

(v/v) (Volumen / Volumen total) x 100

ρ0 Célula rho zero, carente de ADN mitocondrial

INTRODUCCIÓN

1 La mitocondria: estructura, morfología y funciones.

Las mitocondrias son orgánulos presentes en el citosol de todas las células eucariotas de metabolismo aeróbico, cuya principal función es la oxidación de metabolitos, destinando la energía liberada en dichos procesos oxidativos a la generación de la mayor parte del ATP celular (Alberts et al, 2010). Las mitocondrias desempeñan un papel muy importante en el metabolismo celular, e intervienen en procesos celulares como la apoptosis, la homeóstasis del calcio y del sodio, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la respuesta inmune (Reichert y Neupert, 2004; Pinkoski et al, 2006).

Las mitocondrias están formadas por dos membranas, una interna y otra externa, que determinan la existencia de dos compartimientos, conocidos como matriz mitocondrial y espacio intermembrana (Palade 1953). La membrana externa separa el orgánulo del citoplasma y es permeable a iones y pequeñas moléculas inferiores a 10 kDa. En ella se encuentran distintas translocasas de membrana externas denominada complejos TOM o SAM, que son las principales vías de entrada para moléculas proteicas de mayor tamaño. Por otro lado, la membrana interna contiene numerosos complejos enzimáticos y es altamente selectiva, necesitando de la presencia de sistemas de transportadores de membrana, como los complejos TIM22/TIM23 y la translocasa OXA1, para el transporte al interior de la mitocondria. Dicha membrana forma invaginaciones llamadas crestas mitocondriales, que aumentan la superficie para el asentamiento de dichos complejos y enzimas. La matriz mitocondrial contiene iones, metabolitos, 1-10 copias de ADN circular bicatenario conocido como ADN mitocondrial (ADNmt) y ARN mitocondriales y mitorribosomas que realizan la síntesis de algunas proteínas mitocondriales.

2 Genoma mitocondrial

Las mitocondrias poseen un genoma propio denominado ADNmt, formado por una molécula circular de doble cadena de 16.569 pares de bases (Anderson et al, 1981; Andrews et al, 1999) que se replica y transcribe en la matriz mitocondrial (Clayton 1982; Clayton 1991). El ADNmt de mamíferos contiene 37 genes distribuidos entre las cadenas H (cadena pesada) y la L (cadena ligera), así denominadas por su diferente densidad en gradientes de CsCl (Kasamatsu y Vinograd, 1974). Dichos genes codifican 2 ARN ribosómicos (ARNr) (ARNr 12S y 16S), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 subunidades de los complejos del sistema OXPHOS mitocondrial (Figura 1). El ADNmt

posee una región no codificante de 1,1 kb conocida como región de control que contiene los orígenes de transcripción de la cadena pesada (HSP) y ligera (LSP), el origen de replicación de la cadena pesada (O_H) y elementos de regulación del ADNmt. El origen de replicación de la cadena ligera (O_L) se encuentra situado entre los genes de los tARN^{Cys} y tARN^{Asn} a dos tercios de la longitud total del genoma respecto a O_H .

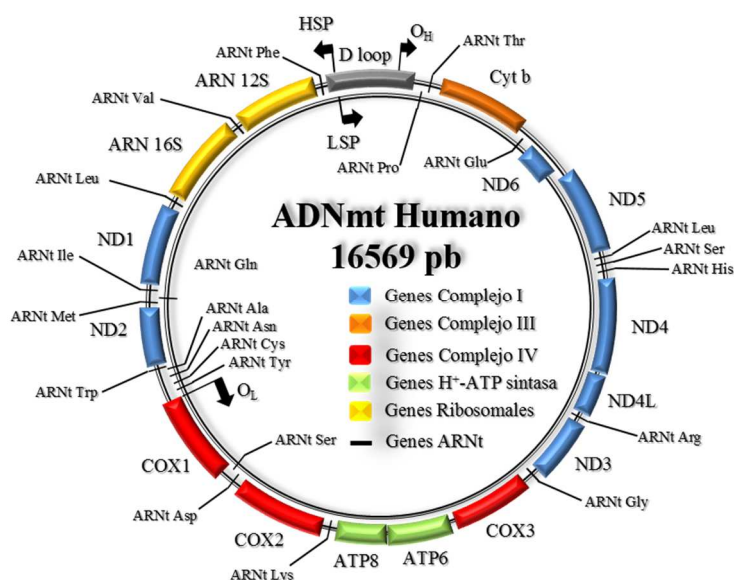


Figura 1. Representación del ADN mitocondrial (ADNmt) humano.

Los círculos representan la doble cadena de ADN donde se localizan los genes que codifican las 13 subunidades de cadena respiratoria, los 22 ARN de transferencia (ARNt), así como los ARN ribosómicos 12S y 16S. El origen de replicación y la dirección de síntesis vienen marcados por O_H para la hebra pesada (línea interior) y por O_L la hebra ligera (línea exterior).

A diferencia del genoma nuclear, el genoma mitocondrial de mamíferos se hereda por vía materna (Giles, Blanc et al, 1980). Además el ADNmt posee una naturaleza poliploide, lo que define el fenómeno de heteroplasmia cuando coexisten más de un tipo de ADNmt en una célula o individuo, frente a la condición de homoplasmia, que se da cuando todas las moléculas de ADNmt son idénticas (Dimauro y Hirano 1993). Asimismo, cuando una mutación está presente en todas las copias del genoma mitocondrial se denomina mutación homoplásmica, mientras que cuando solo está presente en una fracción del total de copias del ADNmt, se denomina mutación heteroplásmica. Esto lleva a definir otra característica del genoma mitocondrial, denominada efecto umbral (Taylor y Turnbull, 2005), que representa la proporción mínima de ADNmt mutado necesaria para que se manifieste fenotípicamente el defecto mitocondrial en un órgano o tejido.

3 Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)

El metabolismo mitocondrial tiene como función principal la producción de energía a partir de la oxidación aeróbica de sustratos. Todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final de respiración celular en la que la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP. Se

define fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *Oxidative Phosphorylation System*) como el proceso por el cual se genera ATP como resultado de la transferencia de electrones desde los equivalentes reductores del NADH o el FADH₂ al O₂ molecular a través de una serie de transportadores electrónicos.

El sistema OXPHOS se localiza en la membrana interna mitocondrial y consta de una cadena de transporte electrónico o cadena respiratoria mitocondrial (CRM), formada por cuatro complejos enzimáticos multiprotéicos: NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I o CI), succinato: ubiquinona oxidoreductasa (complejo II o CII), ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa o complejo *bc1* (complejo III o CIII) y citocromo c oxidasa (complejo IV o CIV). Además, está constituida por dos transportadores móviles de electrones, la ubiquinona o coenzima Q (CoQ) y el citocromo c (cyt c), ambos localizados en la membrana interna mitocondrial (Green y Tzagoloff, 1966), y por el complejo H⁺-ATP sintasa o complejo V. El flujo de electrones que parte bien desde el NADH o desde el FADH₂ pasa secuencialmente por el complejo I o complejo II, respectivamente, para seguir por la ubiquinona o CoQ, el complejo III y el citocromo c, para llegar finalmente al complejo IV, que cederá los electrones al O₂ molecular generando H₂O. Este flujo de electrones a través de los complejos de la CRM está acoplado a un bombeo de protones desde la matriz al espacio intermembrana a través de los complejos I (4H⁺), III (4H⁺) y IV (2H⁺) (Figura 2), y como consecuencia, se genera un gradiente electroquímico (Δp) de protones a través de la membrana interna, que proporciona la energía libre necesaria para la síntesis de ATP a través del complejo V o H⁺-ATP sintasa, que acopla el flujo de protones a la fosforilación del ADP. De esta forma, el consumo de oxígeno que se produce en la CRM se encuentra acoplado a la fosforilación del ADP aprovechando el gradiente electroquímico de protones, mecanismo que se conoce como acoplamiento quimiosmótico (Mitchell, 1976; Reid et al, 1966).

Los complejos del sistema OXPHOS contienen subunidades codificadas por ambos genomas nuclear y mitocondrial, a excepción del complejo II cuyo origen es enteramente nuclear. El ADNmt codifica 7 de las 44 proteínas que forman el complejo I (subunidades ND1-6 y ND4L), una subunidad (apocitocromo b, CYTB) de las 11 subunidades del complejo III, tres subunidades (COX1, COX2, COX3) de las 14 proteínas del complejo IV, y dos proteínas (subunidades 6 y 8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (Figura 1). El resto de las proteínas que forman parte de estos 4 complejos, las 4 subunidades del complejo II, y las proteínas de replicación y

transcripción de ADNmt están codificadas por genes nucleares (Attardi y Schatz, 1988; Herrmann and Neupert, 2000). Las subunidades nucleares se sintetizan en los ribosomas citosólicos y se importan a la mitocondria, donde se ensamblan junto a los grupos prostéticos y las subunidades codificadas por el genoma mitocondrial, formando los complejos de la cadena respiratoria con la ayuda de chaperonas o factores de ensamblaje específicos (Fontanesi et al, 2008; McKenzie y Ryan, 2010; Zara et al, 2009).

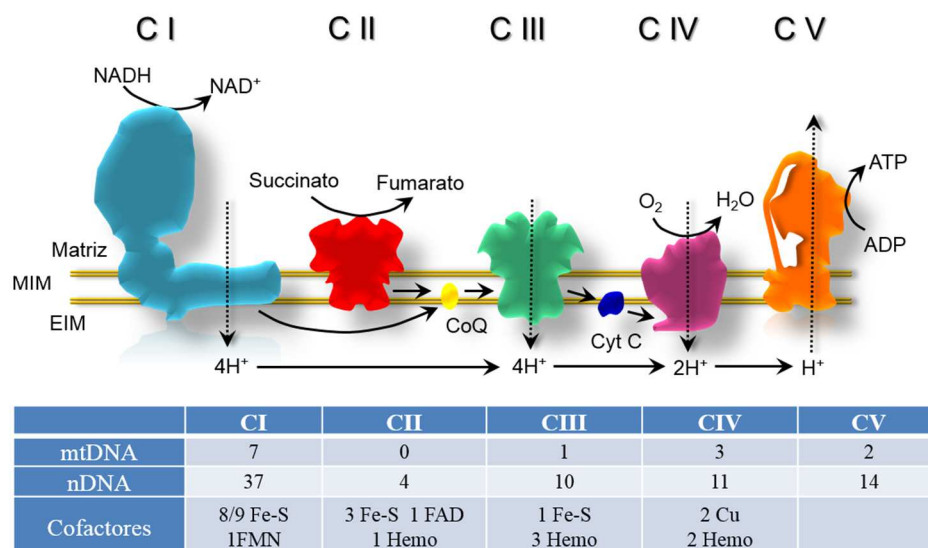


Figura 2. Sistema de Fosforilación Oxidativa (OXPHOS). El esquema muestra los complejos de la cadena respiratoria indicando en qué puntos se produce el bombeo de protones hacia la matriz mitocondrial. Se indica número de subunidades de origen nuclear y mitocondrial y los cofactores que contienen cada uno de los complejos. Cyt c: citocromo c, CoQ: ubiquinona oxidada. MIM; membrana interna mitocondrial. EIM; espacio intermembrana.

4 Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

4.1 Complejo I

4.1.1 Estructura y composición

El complejo I o NADH ubiquinona oxidoreductasa (EC 1.6.5.3) es el complejo de mayor tamaño del sistema de OXPHOS. Se encarga de transferir dos electrones desde el NADH a la ubiquinona (Q) para generar ubiquinol (QH₂) acoplado con el bombeo de 4 protones desde la matriz al espacio intermembrana. Los electrones son transferidos secuencialmente en una cascada de 9 centros hierro-azufre con la ubiquinona como aceptor final. En mamíferos está compuesto de 44 subunidades, de las cuales 7 son codificadas por el ADN mitocondrial (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6) y las 37 subunidades restantes son codificadas por el ADN nuclear. Aunque se desconoce su estructura atómica, gracias a estudios cristalográficos y de microscopía se ha podido determinar que el complejo I presenta forma de “L” o “bota” con dos regiones funcionalmente bien definidas (Clason et al, 2010; Djafarzadeh et al, 2000; Grigorieff,

1998; Guenebaut et al, 1998; Hinchliffe and Sazanov, 2005; Hofhaus et al, 1991; Sazanov et al, 2003; Sazanov and Hinchliffe, 2006). Por un lado, contiene una región hidrofílica denominada “brazo periférico”, que está orientado hacia la matriz mitocondrial y en la que tiene lugar la transferencia de electrones y por otro lado, una región hidrofóbica denominada “brazo de membrana” que está localizada en la membrana interna y en la que se produce la transferencia de protones. Estas dos regiones a su vez se dividen en tres módulos funcionales: el módulo flavoprotéico o módulo N está localizado en el brazo periférico, contiene la actividad deshidrogenasa responsable de la oxidación de NADH a NAD⁺ y está formado por las subunidades NDUFV1-2 y NDUFS1-2-3-7-8; el módulo de proteínas hierro-azufre o módulo Q se localiza en la zona de unión entre el brazo periférico y de membrana, contiene el sitio de reducción del CoQ; y el módulo P corresponde al brazo de membrana encargado de la translocación de protones y que contiene las siete subunidades ND mitocondriales. Además, mediante el uso de detergentes suaves como LDAO (*lauryldimethylamine N-oxide*) se ha dividido el complejo I en 4 subcomplejos estructurales: I α , I β , I γ y I λ (Rolf et al, 2006). El subcomplejo I α está formado por 9 subunidades correspondientes al brazo periférico más la parte más proximal del brazo de membrana. El subcomplejo I λ forma parte de I α y representa a las subunidades que forman el brazo periférico. El subcomplejo I β contiene 14 subunidades que corresponden a la mayor parte del brazo de membrana. Algunas subunidades, tales como ND1, ND2, ND3, ND4L y NDUFC1 que no se detectaron en los subcomplejos I α y I β tras solubilizar con detergentes forman parte de la fracción soluble denominada subcomplejo I γ .

4.1.2 Ensamblaje del complejo I

Los primeros estudios propusieron un modelo semisecuencial conservado evolutivamente, donde el brazo periférico y el de membrana se ensamblarían independientemente mediante la asociación de distintos módulos funcionales uniéndose ambos brazos en las etapas finales para formar el complejo I totalmente ensamblado (Antonicka et al, 2003; Ugalde et al, 2004). Actualmente, existen pequeñas diferencias en la incorporación de unidades específicas entre los distintos modelos de ensamblaje descritos (Antonicka et al, 2003; Lazarou et al, 2009; Ugalde et al., 2004; Vogel et al, 2007a). Se acepta por consenso una ruta semisecuencial de ensamblaje del complejo I de 7 etapas. Como primer paso, las subunidades NDUFS2 y NDUFS3 se unirían para formar un intermediario del módulo Q, al que se unen las subunidades NDUFS7 y

NDUFS8, dando lugar a un segundo y tercer intermediarios, al que posteriormente se incorporarían NDUFA9 y otras subunidades (Antonicka et al, 2003; Lazarou et al, 2007; Ugalde et al, 2004b; Vogel et al, 2007a; Vogel et al, 2007c). Este intermediario, formado por subunidades hidrofílicas del brazo periférico, se anclaría a la membrana gracias a su unión con la subunidad mitocondrial ND1 (Antonicka et al, 2003; Bourges et al, 2004; Lazarou et al, 2007). Como resultado se generaría un subcomplejo de ~400 kDa, que corresponde al cuarto estadio de ensamblaje, que sirve como anclaje y estabilización en la membrana interna de la subunidad ND1 recién sintetizada (Lazarou et al, 2007). En este proceso de anclaje son necesarios los factores de ensamblaje NDUFAF3 (C6orf66), NDUFAF4 (C3orf60), NDUFAF5 (C20orf7) y NDUFAF6 (C8orf38) (Saada et al, 2009; Zurita et al, 2012). Por otro lado, las subunidades ND2, ND3, ND4L y NDUFB6 del brazo de membrana formarían un subcomplejo de ~460 kDa, que se uniría al subcomplejo de ~400 kDa además de a las subunidades ND6, NDUFA13 y NDUFB8 (Perales-Clemente et al, 2010; Szklarczyk et al, 2011) y en un segundo paso a las subunidades ND4, ND5 y NDUFC2 (Gershoni et al, 2010; Perales-Clemente et al, 2010) para generar un quinto intermediario de ensamblaje de ~650 kDa (Perales-Clemente et al, 2010). Para la correcta formación de este intermediario son necesarios los factores de ensamblaje que conforman el complejo MCIA (*mitochondrial complex I assembly*): NDUFAF1, Ecsit, ACAD9, TIMMDC1, TMEM126B y NDUFA11 (Dunning et al, 2007; Kuffner et al, 1998; Vogel et al, 2007b; Heide et al, 2012; Andrews et al, 2013;

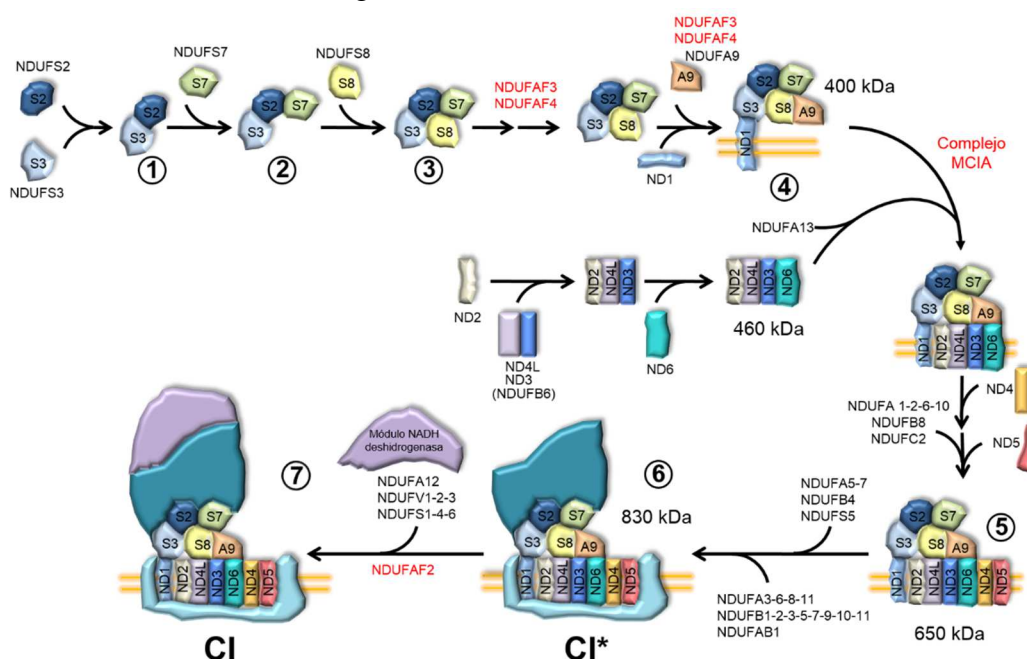


Figura 3. Ruta de ensamblaje del complejo I. Las subunidades estructurales se indican en negro, los factores de ensamblaje en color. Los pesos moleculares de los intermediarios de ensamblaje, enumerados del 1 al 7, se expresan en kDa.

Guarani et al, 2014). En uno de los últimos pasos las subunidades NDUF5, NDUF7, NDUF11, NDUF1-1-6-8-10, se incorporan para formar un intermediario de 830 kDa (sexta etapa del ensamblaje). Al intermediario de 830 kDa se uniría el factor de ensamblaje NDUF2 (Ogilvie et al., 2005), para mediante la unión del módulo deshidrogenasa (NDUF12, NDUFV1-2-3, NDUF1-2-6) y la subunidad NDUF4 generar el complejo I activo (Dieteren et al, 2008; Lazarou et al, 2007; Vogel et al, 2007b) (Figura 3).

4.2 Complejo II

4.2.1 Estructura y composición

El complejo II o succinato coenzima Q reductasa (EC 1.3.5.1) es un complejo proteico ligado a la MIM que interviene en el ciclo de Krebs y en la CRM reduciendo la ubiquinona a ubiquinol. El complejo II es el complejo más pequeño de la CRM (123 kDa) y consta de cuatro subunidades nucleares SDHA, SDHB, SDHC, y SDHD. Las dos subunidades hidrofílicas, SDHA contiene FAD y SDHB que contiene tres centros Fe-S, se unen a SDHC y SDHD, dos pequeños polipéptidos hidrofóbicos que contienen un grupo hemo b y anclan el complejo II a la MIM (Sun et al. 2005). El dímero SDHA/B posee actividad enzimática succinato deshidrogenasa (SDH) que oxida succinato a fumarato. Mediante la actividad succinato:ubiquinona oxidoreductasa (SQR) se transfieren los electrones de la oxidación del succinato, en la interfase del heterodímero SDHC/D, al sitio de unión de la ubiquinona (Q) oxidándose ésta a ubiquinol (QH₂).

4.2.2 Ensamblaje del complejo II

El modelo actual del ensamblaje del complejo II comienza con la unión del grupo hemo b a la subunidad SDHD, seguida de su unión a la subunidad SDHC (Lenaz y Genova, 2010), para formar el módulo de membrana. El grupo hemo b es esencial para la unión del módulo hidrofílico (SDHA+SDHB) al módulo de unión a membrana (SDHC+SDHD). SDHB parece jugar un papel central en la estabilización, ya que las mutaciones en subunidades SDH causan la pérdida de SDHB (Van Nederveen et al, 2009). Actualmente sólo se conocen dos factores específicos del ensamblaje del complejo II, SDHAF1 (Ghezzi et al, 2009) y SDHAF2 (Hao et al, 2009). Se piensa que la función de SDHAF2 está probablemente relacionada con la incorporación del FAD en la subunidad SDHA, mientras SDHAF1 podría desempeñar un papel en la inserción o retención de los grupos Fe-S dentro del complejo II.

4.3 Complejo III

4.3.1 Estructura y composición

El complejo III, complejo bc₁ o ubiquinol-citocromo c reductasa (EC 1.10.2.2) está formado por un homodímero cuya función es transferir los electrones desde el ubiquinol al citocromo c oxidado, produciéndose en paralelo un bombeo de 4 protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. Ha sido cristalizado en varios organismos, incluyendo levadura, pollo y bovino (Hunte et al, 2000; Iwata et al, 1998; Xia et al, 1997; Zhang et al, 1998). En el caso de los procariotas, el complejo III está formado por las tres subunidades catalíticas esenciales: citocromo b, citocromo c₁ y la proteína hierro-azufre de Rieske (RISP), las cuales presentan una alta homología con su ortólogo mitocondrial (Trumpower, 1990). Sin embargo, estudios cristalográficos del complejo III en diferentes especies de eucariotas han revelado que además del núcleo catalítico formado por estas tres proteínas, existen adicionalmente siete u ocho subunidades estructurales en levaduras y mamíferos, respectivamente, que conforman el complejo III activo (Xia et al, 1997; Lange y Hunte, 2002; Nakai et al, 1993). Ninguna de las subunidades estructurales contiene grupos prostéticos ni participan directamente en el bombeo de protones. En mamíferos, la subunidad 11 adicional procede del procesamiento proteolítico de la subunidad RISP. De todas las subunidades que forman el complejo solo el citocromo b es codificado por el ADNmt (Nobrega y Tzagoloff, 1980). El citocromo b contiene dos centros catalíticos redox, el hemo b_L, localizado cerca de la superficie conectado con citocromo c₁ y RISP, y el hemo b_H, localizado hacia el interior de la proteína y orientado hacia la matriz (Nobrega and Tzagoloff, 1980). El citocromo c₁ se caracteriza por un dominio catalítico localizado en EIM y la unión covalente del grupo hemo c₁. RISP presenta una topología similar a la del citocromo c₁, con un dominio catalítico en EIM que contiene un grupo prostético 2Fe-2S y una α -hélice hidrofóbica en la MIM (Hunte et al, 2000).

4.3.2 Ensamblaje del complejo III

El estudio del ensamblaje del complejo III se ha realizado principalmente en *Saccharomyces cerevisiae* mediante el análisis de cepas con deleciones en uno o más genes del complejo (Berden et al, 1988; Grivell, 1989; Tzagoloff, 1995; Zara et al, 2004). La biogénesis del complejo III se iniciaría con la traducción e inserción en la MIM de la subunidad mitocondrial Cob (CYTB). En este primer paso son necesarios los factores de ensamblaje Cbp3, Cbp4 y Cbp6 (Gruschke et al, 2011). Posteriormente se

unirían las subunidades Qcr7 (Subunidad 7) y Qcr8 (Subunidad 8) para formar un subcomplejo de ~230 kDa. A este subcomplejo se añadirían posteriormente las subunidades Cor1 (CORE1), Cor2 (CORE2), la subunidad catalítica Cyt1 (CYC1) y los factores de ensamblaje Bca1 y Cyt2. Por otro lado, se ha descrito tanto en células rho^o como en las cepas mutantes con delecciones de citocromo b, Qcr7 y Qcr8 una interacción entre citocromo c₁ y las subunidades Cor1 y Cor2. Citocromo c₁ y Cor2 estarían asociadas formando un subcomplejo de 100 kDa, mientras que citocromo c₁ y Cor1 formarían un subcomplejo de 78 kDa en ausencia de Cor2 (Zara et al, 2007). En un paso posterior, las subunidades Qcr9 (subunidad 9) y Qcr6 (subunidad 6) se asociarían formando un subcomplejo de 500 kDa (Zara et al, 2009) que dimeriza y al cual se uniría el factor de ensamblaje Bcs1 (BCS1L). El principal papel de Bcs1 es la incorporación de la subunidad RISP en el complejo III (Nobrega et al, 1992, Wagener et al, 2011; Wagener y Neupert, 2012), en la que también participa el factor de ensamblaje Mzm1 (Atkinson et al, 2011; Cui et al, 2012; Sánchez et al, 2013). La subunidad Qcr10 (subunidad 10) sería la última subunidad en insertarse en el complejo III (Figura 4).

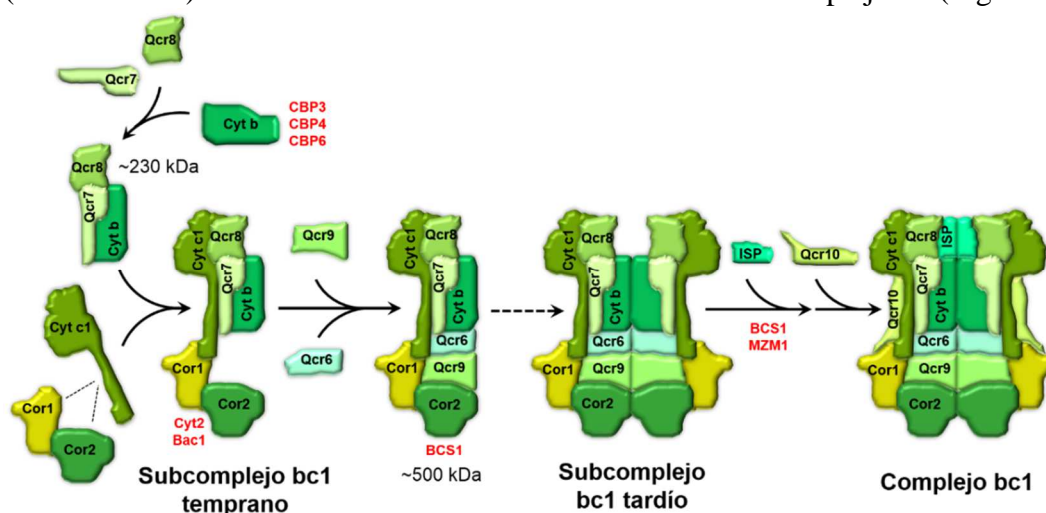


Figura 4. Ruta de ensamblaje del complejo III. Las subunidades estructurales se indican en negro, los factores de ensamblaje en color. Los pesos moleculares de los intermediarios de ensamblaje se expresan en kDa.

4.4 Complejo IV

4.4.1 Estructura y composición

El complejo IV o citocromo c oxidasa (COX) (EC 1.9.3.1) es el componente final de la CRM, encargado de transferir electrones desde el citocromo c reducido al oxígeno molecular para generar agua. Este proceso se genera vía cuatro cofactores metálicos presentes en el núcleo catalítico de la enzima y está acoplado a un bombeo de 4 protones a través de la membrana interna mitocondrial. A mediados de los 90 se

describió por primera vez la estructura cristalográfica bovina del complejo IV, con una resolución de $\sim 2.8 \text{ \AA}$ (Tsukihara et al, 1995; Yoshikawa et al, 1998). En eucariotas, COX es una estructura dimérica formada por 11-14 subunidades (11 en *Saccharomyces cerevisiae* y 14 en mamíferos). Las tres subunidades de mayor tamaño que forman el núcleo catalítico de la enzima (COX1, COX2 y COX3) son codificadas por el ADNmt, mientras que el resto de las subunidades (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C, COX8, NDUFA4) son codificadas por el ADN nuclear (Tsukihara et al, 1996). Estas subunidades son importantes para el ensamblaje, estabilidad, dimerización y modulación de la actividad catalítica, además de proteger al núcleo catalítico frente al daño oxidativo (Arnold and Kadenbach, 1997; Fontanesi et al, 2008; Helling et al, 2008; Horvat et al., 2006; Huttemann et al, 2008). Las subunidades mitocondriales COX1 y COX2 forman el centro redox que participa en la transferencia de electrones. Los electrones entran al centro binuclear de cobre (CuA) de la subunidad COX2, la cual también media la unión electrostática con citocromo c (Zhen et al, 1999). Desde el CuA los electrones pasan a otros centros metálicos de la subunidad COX1, primero al hemo a y después al centro hemo a_3 /CuB (Stiburek et al, 2006). Junto con COX3, las subunidades codificadas por el ADN mitocondrial constituyen el núcleo estructural de la enzima conservado evolutivamente. Por el contrario, COX3 no contiene grupos protéticos y su función no está bien definida. Se ha propuesto que COX3 podría estar involucrada en ensamblaje o estabilidad de COX1 y COX2 o en la modulación del acceso del oxígeno a los centros binucleares (Tordi et al, 1987) o bien modulando la transferencia de protones a través de las subunidades COX1 y COX2 (Hosler, 2004; Hosler et al, 2006).

4.4.2 Ensamblaje del complejo IV

Este proceso comienza con la síntesis *de novo* e incorporación de la subunidad COX1 a la membrana interna mitocondrial, generando un intermediario denominado S1 en el que intervienen activadores traduccionales como Mss51, que estabiliza a COX1 en los pasos previos al ensamblaje (Barrientos et al, 2004; Fontanesi et al, 2010; Perez-Martinez et al, 2003), factores de ensamblaje como COX14 (Barrientos et al, 2004) y COX25 o Coa3 (Fontanesi et al, 2011; Mick et al, 2010) y las chaperonas Ssc1 y Mdj1 (Fontanesi et al, 2010). La subunidad COX1 contiene un grupo hemo a y los centros de Cu necesarios para la actividad de la enzima. La incorporación de estos grupos prostéticos es esencial para la maduración de COX1. En la biosíntesis del grupo hemo

a intervienen las proteínas COX10 y COX15, mientras que en su estabilidad e inserción en COX1 interviene Shy1 (SURF1 en humanos). A la subunidad COX1 se unen las subunidades COX4 y COX5A para formar el segundo intermediario de ensamblaje denominado S2 (Stiburek, et al 2005). La incorporación de centro CuA a COX2 es anterior a la incorporación de COX2 al intermediario S2 y requiere del factor COX18, que incorpora la subunidad COX2 a la membrana interna (Saracco, et al 2002). En levaduras es necesaria la proteína Sco1 para la maduración e incorporación de los grupos CuA en COX2, mientras que en humanos se requieren dos proteínas denominadas SCO1 y SCO2. Seguidamente, se incorporan COX3 y las subunidades nucleares COX5B, COX6C, COX7C y COX8 para formar el intermediario S3 (Williams et al 2004, Stiburek et al 2005, Massa et al 2008). Posteriormente, se insertan las subunidades COX6B, COX7A y COX7B para formar el intermediario S4*, al que finalmente se une la subunidad COX6A, lo que permite que dos monómeros de COX dimericen para generar una estructura estable denominada S4 (Nijtmans et al, 1998) (Figura 5).

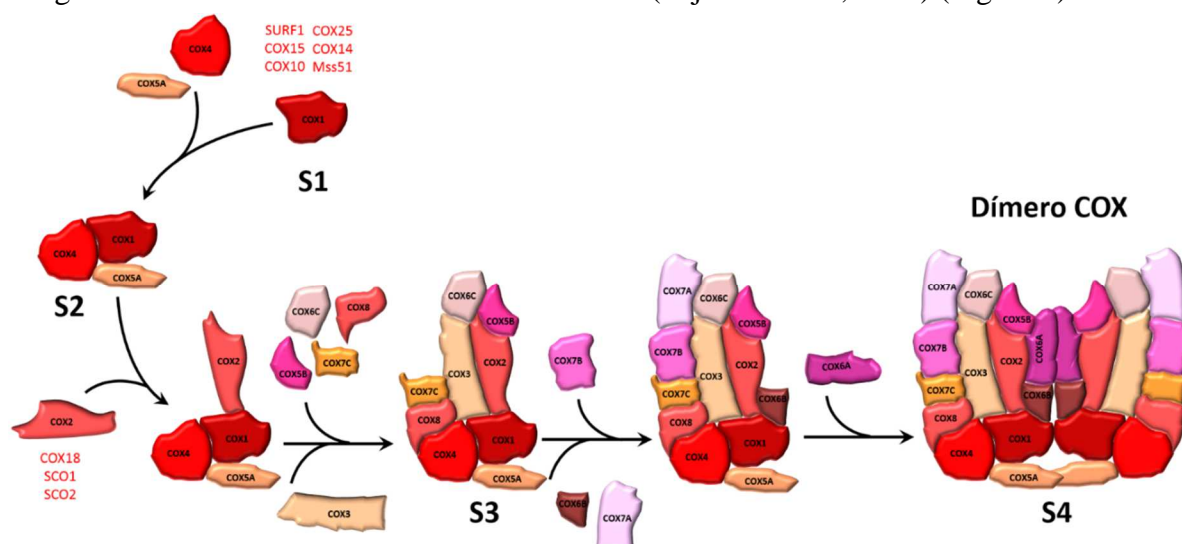


Figura 5. Ruta de ensamblaje del complejo IV. Las subunidades estructurales se indican en negro, los factores de ensamblaje en color

5 Modelos de organización de la cadena respiratoria mitocondrial

En los últimos 60 años se han postulado diferentes modelos de organización de la CRM. Inicialmente se estableció el “modelo sólido” (Chance y Williams, 1955), el cual proponía la asociación de los complejos I-IV siguiendo una secuencia ordenada y rígida. Las evidencias a favor de este modelo se basaron en la copurificación de los complejos I y III (Hatefi, 1967) y la purificación de la actividad succinato citocromo c reductasa (o complejo II+III) en mitocondrias de mamífero (Salach et al, 1967), así como en la relación estequiométrica existente entre los diferentes complejos (Fowler y

Richardson, 1963; Heron et al, 1978). Posteriormente, se propuso un modelo nuevo de organización denominado “modelo fluido” (Kroger y Klingenberg, 1973; Hackenbrock et al, 1986). Dicho modelo postulaba que los complejos de la cadena respiratoria difunden libremente por la membrana interna y que la transferencia de electrones tiene lugar mediante las colisiones al azar entre los complejos y los transportadores móviles. Este modelo se apoyaba en el hecho experimental de que se pudieran aislar individualmente todos los complejos de la cadena respiratoria manteniendo su actividad enzimática, en estudios cinéticos de análisis de coeficientes de difusión que sugerían que todos los componentes redox difunden lateralmente en la membrana interna mitocondrial, así como en la falta de colocalización de los complejos III y IV en ensayos de inmunohistoquímica (Hackenbrock y Hammon, 1979).

A mediados de los 80 se retomó la idea del modelo sólido, al descubrirse la interacción funcional entre los complejos III y IV de bacterias como *Paracoccus denitrificans* y *Thermophilic Bacillus PS3* (Sone et al, 1987; Berry y Trumpower, 1985; Iwasaki et al, 1995) y posteriormente se demostró que en condiciones fisiológicas, la cadena respiratoria actuaba como una unidad funcional en *Saccharomyces cerevisiae* (Boumans et al, 1998).

En el año 2000, gracias a la introducción de detergentes suaves, como la digitonina, en experimentos de purificación mitocondrial y al desarrollo de la técnica de electroforesis azul nativa o *Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE), se describió la asociación de los complejos de la cadena respiratoria en estructuras supramoleculares, denominadas supercomplejos o respirasomas (Schagger y Pfeiffer 2000; Cruciat et al, 2000). Actualmente el desarrollo de técnicas de microscopía electrónica y crioelectrotomografía está permitiendo la proyección de los supercomplejos mitocondriales purificados en mapas tridimensionales, que permiten localizar la posición relativa y analizar las posibles interacciones físicas de los complejos OXPHOS individuales en los supercomplejos (Dudkina et al, 2005; Minauro-Sanmiguel et al, 2005; Schafer et al, 2006; Heinemeyer et al, 2007; Dudkina et al, 2011). Recientemente, se ha propuesto un nivel superior de organización del sistema OXPHOS en estructuras de mayor peso molecular que los supercomplejos. Dicha organización consistiría en una interacción sucesiva de respirasomas interconectados con el supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}_4$, formando estructuras lineales a las que se ha denominado cordones respiratorios (Bultema et al, 2009). Sin embargo, tanto el modelo fluido como la organización rígida de la cadena respiratoria en forma de supercomplejos explicaban

solo parcialmente la naturaleza funcional del sistema OXPHOS. Actualmente se acepta que tanto el “modelo sólido” como el “modelo fluido” podrían coexistir, dando lugar al “modelo de plasticidad” o de “agregación dinámica”, que postula que los complejos podrían encontrarse bien en forma libre o bien asociarse entre ellos formando los diferentes tipos de supercomplejos, lo que permitiría a las células y tejidos adaptarse a los cambios metabólicos y fisiológicos (Boekema y Braun, 2007; Acin-Perez et al, 2008; Hochman et al, 1985; Koopman et al, 2010; Lenaz and Genova, 2010; Lapuente-Brun et al, 2013).

6 Supercomplejos mitocondriales

La purificación y separación de los supercomplejos de CRM mediante BN-PAGE y ensayos de actividad en gel (IGAs) han demostrado que los complejos individuales que los componen son activos enzimáticamente (Wittig et al, 2007; Schäfer et al, 2006). Se han caracterizado los supercomplejos de un buen número de organismos como bacterias (Schagger, 2002; Stroh et al, 2004; Krause et al, 2006; Sousa et al, 2011; García Montes de Oca et al, 2012), levaduras (Cruciat et al, 2000; Schagger, 2002; Nübel et al, 2009), hongos (Krause et al, 2004; Marques et al, 2007), nematodos (Brys et al, 2010), plantas (Eubel et al, 2004; Boekema y Braun, 2007; Bultema et al, 2009), y mamíferos (Krause et al, 2005; Schagger y Pfeiffer, 2000). Además, se han analizado los supercomplejos en distintos tejidos de mamíferos como cerebro (Wernicke et al, 2010), hígado (Dani et al, 2010), riñón (Reifschneider et al, 2006), corazón (Gomez et al, 2009), músculo esquelético (Lombardi et al, 2009), así como en fibroblastos humanos (Colindres et al, 2007) y híbridos transmitocondriales con alteraciones en la biogénesis del sistema OXPHOS (D'Aurelio et al, 2006).

6.1 Composición

La composición y abundancia de los supercomplejos podría variar en el envejecimiento, entre tejidos o dependiendo de las condiciones fisiológicas del metabolismo celular (Schägger y Pfeiffer, 2000; Gomez et al, 2009; Gómez y Hagen, 2012; Lapuente-Brun et al, 2013). En mamíferos, la mayor parte del complejo I (>90%) se encuentra ensamblado en forma de supercomplejos, mientras que solo un 50% del complejo III y aproximadamente un 20% del complejo IV se asocian en dichas estructuras (Schagger, 2000; Schagger y Pfeiffer, 2000). La solubilización de membranas mitocondriales bovinas permitió separar en geles de BN-PAGE bandas de

pesos moleculares entre 1500-2100 kDa, correspondientes a los supercomplejos que contenían a los complejos I, III y IV individuales en diferentes estequiometrías. Dicha estructuras corresponderían al supercomplejo I+III₂ así como a los supercomplejos I+III₂+IV₁₋₄. Al supercomplejo I+III₂+IV_n se le denominó respirasoma, ya que contenía todas las enzimas redox esenciales para llevar a cabo el transporte de electrones desde el NADH hasta el O₂ en la MIM (Schägger y Pfeiffer, 2000). En corazón bovino la especie de supercomplejo más abundante corresponde al I+III₂+IV₁ (54%), I+III₂ (17%), el I+III₂+IV₂ (9%), el I+III₂+IV₃ (3%) y el I+III₂+IV₄ (1%) (Schagger y Pfeiffer, 2001). En ensayos de actividad en gel se observó actividad NADH-deshidrogenasa del complejo I en los supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV₁₋₄ mientras que la actividad citocromo c oxidasa solo se observó en el supercomplejo I+III₂+IV₁₋₄ (Schäfer et al, 2006). Además las medidas espectrofotométricas de las actividades catalíticas mostraron que el complejo I presenta la mitad de actividad en el supercomplejo I+III₂ que en el I+III₂+IV₁, mientras que el complejo III es inactivo en el supercomplejo I+III₂ pero no en el supercomplejo I+III₂+IV₁ (Schäfer et al, 2006), sugiriendo que la forma activa del respirasoma es el supercomplejo I+III₂+IV₁. Otros estudios han propuesto formas alternativas de supercomplejos que, además de los complejos I, III y IV contendrían al complejo II y a la H⁺-ATP sintasa (o complejo V) (Acin-Perez et al, 2008; Wittig y Schagger, 2009). Una de estas estructuras contendría a todos los complejos de la CRM (complejos I, II, III y IV), además de los transportadores de electrones citocromo c y CoQ y podría consumir oxígeno, lo que reflejaría la correcta disposición de los complejos y transportadores de electrones en una estructura funcional (Acin-Perez et al, 2008). Por otro lado, en *S. cerevisiae*, que carece de complejo I, se observan dos bandas de ~750 y ~1000 kDa que corresponden los supercomplejos III₂+IV₁ y III₂+IV₂ respectivamente (Schagger y Pfeiffer, 2000). En el caso mitocondrias bovinas tratadas con digitonina, solo se detecta la formación del supercomplejo III₂+IV₁ (Schagger y Pfeiffer, 2001).

6.2 Estructura

La primera proyección en 2D del supercomplejo I+III₂ en plantas, mostraba que el complejo III se une lateralmente a la porción concava del brazo hidrofóbico del complejo I (Dudkina et al, 2005). Los primeros datos sobre forma y tamaño de los supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV₁ en mamíferos se obtuvieron mediante análisis de microscopia electrónica y extrapolación de las estructuras de rayos X de los complejos

individuales a partir de mitocondrias aisladas de corazón bovino. De esa forma se pudo determinar la orientación de los complejos I, III y IV en la estructura de los supercomplejos, así como los sitios hipotéticos de interacción con el citocromo c y la ubiquinona (Schäfer et al, 2006; Schäfer et al, 2007). En dicha representación del respirasoma de mamíferos, el monómero distal del complejo III (el monómero más alejado del complejo I), se encontraría interaccionando hacia el exterior con la bicapa lipídica, mientras que el monómero más cercano al complejo I, denominado monómero proximal, interaccionaría con el brazo de membrana del complejo I. El monómero proximal del complejo III se encontraría a una distancia de 13 nm del brazo de membrana del complejo I y su sitio de unión al ubiquinol estaría expuesto para permitir una eficiente transferencia de electrones entre ambos complejos (Althoff et al, 2011; Dudkina et al, 2011). Se ha propuesto que el monómero proximal del complejo III podría ser más eficaz en la oxidación del ubiquinol, mientras que el monómero distal podría ser necesario para transferir electrones desde RISP al citocromo c (Castellani et al, 2010). Por otro lado, el complejo IV se situaría en el extremo más distal del brazo de membrana del complejo I, compartiendo una pequeña área con el complejo III (Vonck y Schafer, 2009) (Figura 6). Los sitios de unión para el citocromo c en los complejos III y IV están separados por una distancia de 10-11 nm. El citocromo c tiene un diámetro de 3,4 nm, lo que significaría que necesitaría cruzar una distancia de sólo 3 veces su tamaño para pasar del complejo III al complejo IV en el supercomplejo (Althoff et al, 2011). En general, la disposición de los complejos I, III y IV en los supercomplejos y las cortas distancias entre los sitios de unión a ubiquinona y citocromo c de los diferentes complejos, sugiere que los electrones son canalizados a través de distancias cortas a lo

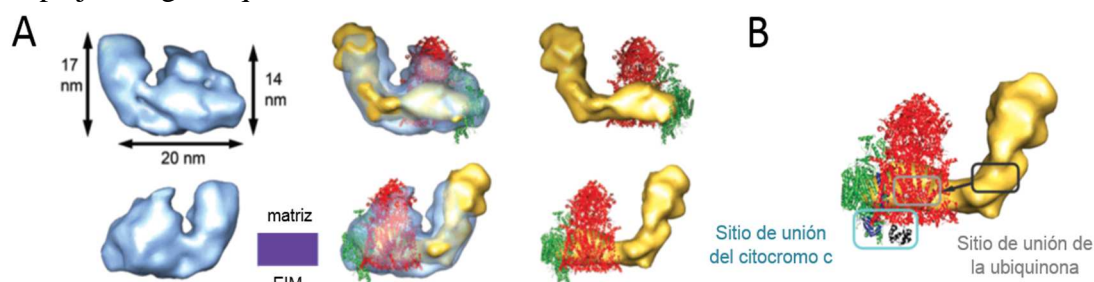


Figura 6. Proyección en 3D del supercomplejo I+III₂+IV₁ de mamíferos. (A) La columna de la izquierda muestra en azul la superficie total de la proyección en 3D del supercomplejo I+III₂+IV₁. La columna central muestra la proyección en 3D con la superficie del complejo I, en amarillo, en semitransparente y las estructuras de rayos X correspondientes a los complejos III y IV, en rojo y verde respectivamente. La columna de la derecha resalta la posición de los complejos III y IV en la estructura de los supercomplejos. (B) Vista lateral del supercomplejo I+III₂+IV₁ con los sitios de unión de los transportadores electrónicos coenzima Q y citocromo c. Figura modificada de Schäfer et al, 2007.

largo de una ruta predefinida. Estudios posteriores mediante crio-electrotomografía a una resolución de 2,2 nm han revelado que los complejos I, III y IV estarían separados a una distancia de entre 2-5 nm, por lo que existirían en el supercomplejo I+III₂+IV₁ pocos puntos de contacto directo entre los complejos individuales (Dudkina et al, 2011), sugiriendo que existe una interacción débil entre ellos y que su asociación en el supercomplejo estaría mediada por interacciones lípido-proteína, lo que facilitaría la difusión del ubiquinol entre los complejos I y III.

6.3 Funciones de los supercomplejos

6.3.1 Aumento de la eficiencia del flujo de electrones y de la canalización de sustratos

Debido a la disposición estructural de los complejos de CRM en los supercomplejos, una de las posibles funciones podría ser aumentar la eficiencia del flujo de electrones entre los complejos individuales, lo que permitiría reducir la distancia de difusión de los electrones entre los complejos y los transportadores electrónicos ubiquinona y citocromo c. Por ejemplo el supercomplejo I+III₂+IV₁ presentaría mayor actividad enzimática de los complejos I y III que el supercomplejo I+III₂ (Schäfer et al, 2006). Estos datos sugieren que, la presencia del complejo IV en los supercomplejos aumentaría la eficiencia catalítica del sistema OXPHOS (Schaefer et al, 2006). La canalización de los sustratos entre los complejos asociados a su vez permitiría aumentar su eficacia catalítica (Heinemeyer et al, 2007; Lenaz y Genova, 2010; Schagger, 2001). Se entiende como canalización de sustratos al proceso de transferencia directa de un intermediario metabólico entre los sitios activos de dos enzimas que catalizan reacciones secuenciales en una ruta biosintética. La organización de los complejos del sistema OXPHOS en estructuras de supercomplejos permitiría evitar que la CoQ y el citocromo c difundieran al medio soluble. Dichos sustratos serían canalizados a través de los complejos I y III o III y IV respectivamente, aumentando así la eficacia catalítica del sistema OXPHOS. El análisis de los coeficientes de respiración de los complejos respiratorios mediante control de flujo en mitocondrias aisladas ha permitido determinar la existencia de una asociación funcional entre los complejos I y III, de manera que ambos complejos se comportan como uno solo (Bianchi et al, 2004). En el caso del complejo II la oxidación del succinato es limitante, de modo que no parece existir canalización de sustratos entre los complejos II y III, sino que el CoQ actuaría como intermediario difundiendo entre ambos complejos libremente a través de la membrana. En el caso del citocromo c, no se ha podido demostrar mediante análisis de control de

flujo la existencia de una asociación funcional entre el complejo IV y otros complejos, posiblemente debido a la gran proporción de complejo IV libre presente en las mitocondrias de mamíferos o al rápido intercambio entre citocromo c unido o el citocromo c libre.

6.3.2 Disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno

Se ha sugerido que los supercomplejos podrían tener un papel importante en reducir la fuga de electrones a partir de los complejos del sistema OXPHOS y en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lenaz y Genova, 2009). Durante la fosforilación oxidativa, una pequeña proporción de los electrones reaccionan con el oxígeno, transformándolo en ROS (Jastroch et al, 2010). Existen diferentes fuentes de ROS, que pueden ser de importancia tanto en la transducción de señales celulares como en condiciones patológicas. Aunque una elevadas concentraciones de ROS pueden resultar tóxicas para la célula, en condiciones fisiológicas desempeñan un papel relevante como moléculas señalizadoras implicadas en una gran variedad de respuestas celulares como la muerte celular por apoptosis (Spierings et al, 2005), la proliferación celular (Owusu-Ansah et al, 2008) y la diferenciación celular (Hamanaka, Chandel, 2013). Los componentes redox responsables de la generación del anión superóxido se encuentran en los complejos I y III de la CRM. Recientes estudios donde se midieron los niveles de ROS en mitocondrias de corazón bovino tratadas con laurilmaltosido y en supercomplejos I+III₂ reconstituidos mediante liposomas, se observó un aumento de ROS en los casos de disrupción o prevención de la asociación de los complejo I y III. Estos resultados demuestran por primera vez que la disociación del supercomplejo I+III₂ en la membrana mitocondrial es causa de estrés oxidativo vía complejo I, confirmando que la formación de los supercomplejos limita la producción de ROS (Maranzana et al, 2013).

El análisis de fibroblastos procedentes de ratones “*knockout*” para la subunidad RISP del complejo III mostró niveles elevados de ROS asociados con la desestabilización del complejo I y de los supercomplejos I+III₂+IV_n (Diaz et al, 2012). Estos estudios sugieren que, el aumento localizado de los niveles de ROS afectaría al ensamblaje y la estabilidad del complejo I y de los supercomplejos, y que la estabilidad de los complejos I y IV y de los supercomplejos podría estar regulada por los niveles de ROS en el contexto de una fosforilación oxidativa deficiente (Diaz et al, 2012). Recientemente, tres grupos de investigación han descrito de forma independiente las

proteínas Rcf1 y Rcf2 en *S. cerevisiae* (Rcf; “*respiratory supercomplex factor*”), que actúan como factores de ensamblaje de los supercomplejos (Chen et al, 2012; Vukotic et al, 2012; Strogolova et al, 2012). Rcf1 estabilizaría al supercomplejo III₂+IV₂ de levaduras, lo que aumentaría la eficiencia en la transferencia de electrones entre los complejos III y IV a través del citocromo c y restringiría la generación de ROS (Chen, et al 2012; Vukotic, et al 2012).

6.3.3 Estabilidad y ensamblaje

La formación de los supercomplejos también parece ser necesaria para mantener la estabilidad de sus componentes individuales, ya que existe una interdependencia estructural entre los complejos de la cadena respiratoria. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que regulan estas interdependencias estructurales. El análisis de los supercomplejos tanto en muestras de pacientes con déficits aislados del sistema OXPHOS (Schägger et al, 2004), como en modelos celulares portadores de mutaciones en subunidades de distintos complejos OXPHOS revelaron que los complejos III y IV son esenciales tanto para la estabilización del complejo I como para la formación del respirasoma (Schägger et al, 2004; Acín-Pérez et al, 2004; Díaz et al, 2006; D'Aurelio et al, 2006).

Asimismo, la ausencia del citocromo c generaba defectos de ensamblaje del complejo IV, afectando secundariamente a la estabilidad del complejo I y de los supercomplejos (Vempati et al, 2009). Además, mutaciones patogénicas en factores de ensamblaje del complejo III, conllevan a déficits combinados de los complejos I y III, e incluso del complejo IV en los tejidos afectados (Díaz et al, 2012; Fernandez-Vizarra et al, 2007; Lamantea et al, 2002; Moran et al, 2010a; Vempati et al, 2009). Por el contrario, las mutaciones del complejo I en general no parecen afectar a la estabilidad de otros complejos de CRM (Schägger et al, 2004; Pineau et al, 2005) mientras que en otros se reduce significativamente la cantidad de complejos III y IV (Grad y Lemire, 2004; Grad y Lemire, 2006; Ugalde et al, 2004). Sin embargo, se han descrito mutaciones en determinadas subunidades del complejo I que pueden conducir a déficits enzimáticos de los complejos I y III o I y IV (Budde et al, 2000; Saada et al, 2012; Ugalde et al, 2004). Se desconoce la razón de estas discrepancias, pero podrían relacionarse con la especificidad de la mutación o de las subunidades del complejo I mutadas, algunas de las cuales podrían estar involucradas en la interacción con otros complejos.

6.4 Ensamblaje de los supercomplejos

A diferencia del ensamblaje de los complejos individuales de CRM, de los cuales se conocen en parte las rutas y los factores de ensamblaje que intervienen, se sabe muy poco acerca del proceso biosintético de los supercomplejos mitocondriales. Los primeros resultados se obtuvieron mediante experimentos de pulso-caza, marcando radioactivamente las proteínas codificadas por el ADNmt y analizando en el tiempo su incorporación en los complejos individuales y supercomplejos (Acín-Perez et al, 2008). Los resultados obtenidos sugerían que la formación de los supercomplejos tiene lugar una vez se han ensamblado los complejos individuales, debido al lapso de tiempo existente entre la detección de los complejos individuales y de los supercomplejos. Sin embargo, otros estudios apuntan a que el ensamblaje de los supercomplejos podría tener lugar mediante la asociación de intermediarios de los complejos de CRM y no de los complejos individualmente ensamblados. En levaduras, por ejemplo, subcomplejos de COX interaccionarían con el complejo bc1 en estadios tempranos del ensamblaje de los supercomplejos (Mick et al, 2007). En células derivadas de pacientes con déficit de complejo IV las subunidades nucleares COX sintetizadas de *novο* se asocian a los supercomplejos en ausencia del complejo IV (Lazarou et al, 2009). En estudios en células humanas, la interferencia del factor de ensamblaje Cox17, sugieren que la formación de los supercomplejos puede depender de la síntesis de novo de subunidades o intermediarios de ensamblaje del complejo IV. Estos resultados sugieren que la formación de los supercomplejos no tiene lugar con posterioridad a la de los complejos individuales, sino que el ensamblaje y asociación entre complejos individuales es un proceso coordinado (Oswald et al, 2009). Asimismo, en muestras de pacientes con mutaciones en las subunidades del módulo N catalítico del complejo I se observa la acumulación de supercomplejos parcialmente ensamblados que contienen el intermediario de 830 kDa del complejo I asociado a los complejos III y IV, dicho intermediario también se ha encontrado asociado a las subunidades CORE1 y CORE2 del complejo III en un supercomplejo parcialmente ensamblado en células de pacientes y tejidos de ratones mutados (Calvaruso et al, 2012; Lazarou et al, 2007), lo que sugiere que la formación del complejo I totalmente ensamblado podría depender de la asociación de este intermediario con los complejos III y IV (Lazarou et al, 2009).

Mutaciones en el gen de *BCSL*, implicado en el ensamblaje de la subunidad RISP en el complejo III, reveló la acumulación de las proteínas CORE en un

intermediario de supercomplejos que carece de la proteína RISP (Fernandez-Vizarra et al, 2009). Por otro lado, la presencia de la subunidad RISP del complejo III no se requiere ni para mantener la estabilidad del complejo I ni para la formación de los supercomplejos (Díaz et al, 2012). El ensamblaje parcial del complejo III en células carentes de RISP era suficiente para estabilizar al complejo I y la formación de los supercomplejos.

6.5 Factores de ensamblaje de los supercomplejos

En levaduras se han descrito las proteínas Rcf1 y Rcf2, las cuales son necesarias para la formación y estabilidad del supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}_{1-2}$ (Chen et al, 2012; Vukotic et al, 2012; Strogolova et al, 2012). De igual forma la eliminación de HIG2A, el ortólogo de Rcf1 en humanos, provoca defectos en la formación de los supercomplejos que contienen al complejo IV (Chen et al, 2012). Recientemente se ha descubierto un nuevo factor de ensamblaje de supercomplejos en humanos denominado COX7A2L/COX7RP/SCAFI (Lapiente-Brun et al, 2013; Ikeda et al, 2013). COX7A2L se detecta en las bandas correspondientes a los supercomplejos $\text{III}_2\text{+IV}_1$ y $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$, pero no en los complejo III y IV libres. Según Lapiente-Brun et al, COX7A2L mediaría en el ensamblaje del complejo IV en los supercomplejos minimizando la inhibición competitiva de la respiración entre piruvato y succinato al generar tres poblaciones de complejo IV diferentes: una población que recibe los electrones del NADH (CIV_{NADH}), una de aquellos procedentes del FAD (CIV_{FAD}) y una tercera para los electrones procedentes tanto del NADH como del FAD. Dichos resultados apoyan el modelo de plasticidad e identifican el ensamblaje dinámico de los supercomplejos como un mecanismo a través del cual las células pueden adaptarse a diferentes fuentes de carbono y modular la CRM a los requisitos específicos de cada tipo celular. No obstante, estudios realizados por otros grupos en fibroblastos de ratones “*knockout*” para la proteína COX7A2L (Ikeda et al, 2013) mostraron una disminución de la actividad de complejo IV, del consumo de oxígeno en presencia de piruvato+malato y de succinato y de los niveles de ATP en contraste con los hallazgos de Lapiente-Brun et al 2013 donde no observaron dichos efectos, lo que pone en duda el papel de COX7A2L en la modulación de la actividad de la CRM así como el modelo de plasticidad propuesto en Lapiente-Brun et al 2013. Por otro lado, Ikeda et al, 2013 proponen que COX7A2L podría jugar un papel significativo en la actividad muscular así como en la termogénesis adaptativa *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Pacientes y controles

Se utilizaron cíbridos transmitocondriales derivados de células *rho zero* (σ^0) fusionadas en presencia de 50% (p/V) de polietilenglicol con fibroblastos enucleados de individuos sanos o de pacientes que presentaban las mutaciones de interés. Este estudio se llevó a cabo en células con mutaciones en homoplasmia. Se analizó la mutación m.4681T>C en la subunidad ND2 del complejo I, presente en un paciente con Síndrome de Leigh y una reducción de la actividad enzimática del complejo I (42% del valor del control mas bajo) (Ugalde et al, 2007). Con respecto al complejo III, la mayor causa de déficit enzimático en dicho complejo se debe a mutaciones en la subunidad citocromo b. Por tanto, se estudió la mutación m.15533A>G (Gil Borlado et al, 2010), presente en un paciente que presentó acidosis láctica, mioglobulinuria, encefalomiopatía y cardiomiopatía, con una reducción del 50% de la actividad de complejo III en músculo esquelético y un déficit combinado de los complejos III y IV en cultivos de fibroblastos (52% y 31% del valor del control más bajo, de los complejo III y IV respectivamente). En relación al complejo IV, se estudió la mutación m.7896G>A (Campos et al, 2001) que afecta a la subunidad COX2 en un paciente que cursó con un enfermedad multisistémica de inicio temprano, el cual presentaba microcefalia, hipotonía, hipertrofia ventricular, retinitis pigmentaria y una reducción del 87% de la actividad citocromo c oxidasa medida espectrofotométricamente. Además se utilizaron cíbridos control, la línea celular 143B206 de osteosarcoma y las células embrionarias humanas de riñón HEK293.

2 Reactivos, soluciones y tampones

Las composición de las soluciones y tampones de uso común empleados en este trabajo, se realizaron de acuerdo con las descripciones detalladas en (*Sambrook y Russel, 2001*). La composición de los medios específicos utilizados en los diferentes experimentos viene detallada y descrita en el apartado de métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

3 Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células se cultivaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, 95% aire y 99% de humedad. Para los cultivos de cíbridos y células HEK293 se utilizó el medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle médium*) a 4,5g/l de glucosa

(Invitrogen), complementado con suero fetal bovino (FBS: *fetal bovine serum*) al 10%, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina y 50 µg/ml de uridina (Lonza).

La descongelación de las diferentes líneas se realizó mediante inmersión rápida de criotubos (Nunc, Thermo Fisher) en un baño a 37°C para su posterior cultivo. Para el subcultivo de las distintas líneas celulares se desagregaron de la placa mediante un tratamiento con Tripsina-EDTA (0,5 mg/ml tripsina, 0,22 mg/ml EDTA) (Lonza) a 37°C. Posteriormente se sembraron en botellas de cultivo T-75 o T-175 (Nunc, Thermo Fisher) en función del número de células necesarias para cada experimento. Los cíbridos transmitocondriales se pasaron cuando alcanzaron una confluencia del 70-80%, mediante dilución 1/20 en controles y 1/8-1/10 en mutantes.

Para la congelación de las diferentes líneas celulares se utilizó una solución de congelación, la cual consiste en el medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma). Una vez desagregadas mediante tratamiento con tripsina, las células se centrifugaron y resuspendieron en 1 ml de esta solución de congelación y se introdujeron en criotubos. Los criotubos se colocaron en contenedores de crioconservación con 2-propanol (Sigma) a temperatura ambiente y se depositaron en congeladores a -80°C para su posterior congelación en nitrógeno líquido.

4 Cíbridos transmitocondriales

Debido a la dificultad de realizar mutagénesis dirigida en el ADNmt se han desarrollado técnicas para generar cíbridos transmitocondriales, que permiten el estudio de los mecanismos patogénicos asociados a mutaciones en el ADNmt (King and Attardi, 1989), ya que permiten expresar un ADNmt previamente seleccionado en células con un fondo nuclear fijo. Estas células se caracterizan por poseer todas ellas el mismo fondo genético nuclear pero diferente carga genética mitocondrial (Chalmers et al., 1996; King and Attardi, 1996). Esta metodología ha sido utilizada con distintos fines, entre los que se incluyen: el estudio fenotípico de mutaciones en el ADNmt (Hayashi, Ohta et al, 1991; Trounce et al, 1994; Vergani et al, 1995; Brown et al, 2001; D'Aurelio et al, 2001), las consecuencias bioquímicas y fisiológicas del ADNmt (Pallotti et al, 2004; Vives-Bauza et al, 2006), estudiar el efecto del fondo genético nuclear sobre la segregación de las mutaciones patogénicas en el ADNmt (Dunbar et al, 1995), demostrar la presencia de recombinación heteróloga del ADNmt en células humanas (D'Aurelio et al, 2004) y analizar la compatibilidad ADNmt-ADNn entre especies

(Bayona-Bafaluy et al, 2005). Sin embargo, aunque su uso ha proporcionado gran cantidad de información, poseen ciertas limitaciones, tales como la heterogeneidad de sus cromosomas, su aneuploidía, su selección mediante agentes mutagénicos, o la dificultad de extrapolación de las correlaciones genotipo-fenotipo establecidas en variaciones genéticas del ADNmt a nivel celular a todo el organismo (Swerdlow, 2007).

Para su construcción, se necesita de líneas carentes de ADNmt denominadas *rho zero* (σ^0) (King y Attardi, 1989; Hayashi et al, 1991). Dichas líneas se obtienen a partir de la línea celular de osteosarcoma 143B206 TK⁻ mediante tratamiento con bromuro de etidio. Estas células pueden ser posteriormente repobladas con mitocondrias mediante fusión bien con citoplastos enucleados (King y Attardi, 1989), o bien con plaquetas portadoras del ADNmt con la mutación patogénica de estudio (Chomyn et al, 1994). De este modo, utilizando la misma línea *rho zero* y diferentes donantes de ADNmt, se obtienen líneas celulares que comparten el mismo fondo genético nuclear pero difieren en su ADNmt. Así, las diferencias fenotípicas que se puedan observar entre células serán debidas necesariamente a los ADNmt que contienen. Todos los cíbridos transmitocondriales se obtuvieron a partir de fibroblastos enucleados bien de individuos sanos o de pacientes que portaban las mutaciones de interés en su ADNmt.

5 Ensayos de doxiciclina

Para analizar la cinética de ensamblaje de los complejos de cadena respiratoria tanto en estructuras individuales como en forma de supercomplejos, los cíbridos transmitocondriales se cultivaron durante 6 días (8 días en el caso de las células HEK293) en un medio de cultivo DMEM con 4,5g/l de glucosa, FBS al 10%, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina, 50 μ g/ml de uridina y 15 μ g/ml de doxiciclina. A dicha concentración la doxiciclina es un inhibidor reversible de la traducción mitocondrial, lo que permite reanudar de forma sincronizada la traducción de proteínas de codificación mitocondrial una vez eliminada del medio (Van den Bogert et al, 1988). La retirada de la doxiciclina del medio de cultivo permite reanudar la síntesis de *ново* de las proteínas mitocondriales, lo que permite analizar la incorporación individual de las proteínas recién sintetizadas en los diferentes complejos OXPHOS. Después de 6-8 días de tratamiento con doxiciclina se recogieron *pellets* mitocondriales mediante tratamiento con digitonina, obteniéndose así el tiempo 0h. A partir de ese punto se cambiaron las células a un medio de cultivo normal sin doxiciclina y se recogieron los *pellets*

mitocondriales mediante tratamiento con digitonina a los tiempos 6h, 15h, 24h, 48h, 72h y 96h. Las células se cultivaron en condiciones exponenciales de crecimiento, manteniéndolas a una confluencia del 60-80% (Figura 10). Esta estrategia se utilizó previamente para estudiar la ruta de ensamblaje del complejo I en la línea celular 143B-206 TK- (Ugalde et al, 2004).

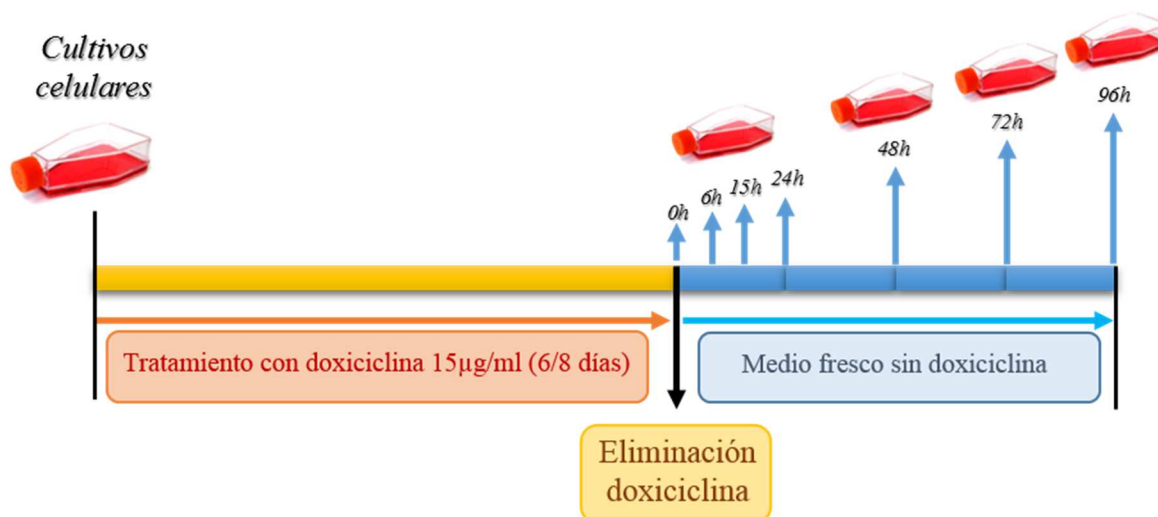


Figura 10. Procedimiento experimental para la inhibición reversible de la traducción mitocondrial mediante tratamiento con doxiciclina. Las células se cultivaron en un medio con doxiciclina durante 6-8 días, al cabo de los cuales se retiró el inhibidor sustituyendo el medio de cultivo por otro medio fresco sin doxiciclina. Las células se crecieron en condiciones exponenciales y se recogieron a los diferentes tiempos (0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas) tras la retirada del inhibidor.

6 Cuantificación del número de copias del ADNmt

La cuantificación relativa del ADNmt frente al nuclear (ADNn) se realizó mediante PCR a tiempo real en un sistema HT7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Andreu et al., 2009). En primer lugar, se extrajo el ADN total de las distintas líneas celulares utilizando para ello el *kit QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen GmbH), la línea de células 143B *rho zero* se utilizó como control negativo. Se cuantificó el ADNmt y ADNn de cada una de las muestras en el mismo pocillo de reacción. Para la cuantificación del ADNmt se usó una pareja de cebadores (oligonucleótido sentido: 5'-CCA CGG GAA ACA GCA GTG AT-3'; oligonucleótido anti-sentido: 5'-CTA TTG ACT TGG GTT AAT CGT GTG A-3') que amplifica un fragmento del gen *MT-RNR1* mitocondrial y una sonda Taqman marcada en 5' con el fluorocromo 6FAM (5'-FAM-

TGC CAG CCA CCG CG-MGB-3') para su detección. Para la cuantificación del ADNn se usó el *Kit Human RNAasaP* (Applied Biosystems), que incluye una pareja de cebadores que amplifica un fragmento del gen nuclear RNAasa P, que se encuentra en monocopia en el genoma haploide, y una sonda TaqMan marcada en 5' con el fluorocromo VIC para su detección. Cada pocillo de reacción contenía un volumen final de 20 µl, que incluía una mezcla 1X de *Taqman universal PCR mastermix* (Applied Biosystems), 1 µl del *kit RNAasa P*, 112 nM de cada cebador del ADNmt, 125 nM de la sonda mitocondrial marcada con 6FAM y 2 o 10 ng del ADN total. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo a 50°C de 2 minutos, 1 ciclo a 95°C de 10 minutos, y 45 ciclos de desnaturalización a 95°C de 15 segundos y de extensión a 60°C de 1 minuto. La cuantificación de las muestras se realizó por duplicado y con dos concentraciones de ADN distintas (2 y 10 ng de ADN total). La cuantificación absoluta del ADNmt y ADNn se calculó usando una curva de calibración realizada por dilución de una solución *madre*, consistente en una mezcla de un número conocido de copias de dos plásmidos, uno con el fragmento del gen *MT-RNR1* del ADNmt y otro con el fragmento del gen RNAasa P nuclear. El número de copias del ADNmt de este calibrador se determinó dividiendo su concentración por el peso molecular de cada plásmido.

7 Marcaje metabólico *in vitro* de proteínas de traducción mitocondrial

Las células 143B se cultivaron durante 6 días en presencia de 15 µg/ml de doxiciplina. Posteriormente se incubaron durante 60 minutos a 37°C en medio DMEM sin metionina que bien contenía 150 µCi/ml de metionina S³⁵ (para el marcaje de proteínas citoplasmáticas) o bien 150 µCi/ml de metionina S³⁵ y 100 µg/ml de emetina (para el marcaje de proteínas mitocondriales), tal como se describe en Leary and Sasarman 2009. Las proteínas celulares se extrajeron mediante el tampón RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% Na-Deoxicolato, 50 mM Tris-HCl pH8.0). Las muestras se separaron mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE al 17,5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su posterior revelado mediante película autoradiográfica. La señal radioactiva fue densitometrada y cuantificada usando la función histograma del programa *Adobe Photoshop* (Adobe Systems Incorporated).

8 Cuantificación de proteínas

Para la medida de la concentración de proteínas, se utilizó el *kit MicroBCA Protein Assay* (Pierce) siguiendo las indicaciones detalladas por el fabricante.

9 Preparación de lisados celulares para separación de proteínas en geles SDS-PAGE

Los cíbridos en cultivo se tripsinizaron, se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C y posteriormente se lavaron dos veces con PBS (Lonza). Por cada 2×10^6 células, se añadieron 125 µl de un tampón de extracción de proteínas en PBS conteniendo n-dodecil β-D-maltósido al 2% (p/v) (DDM, Sigma), 0,1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma) y una mezcla de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche). Tras 15 minutos en hielo, el homogenado celular se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó utilizando el *MicroBCA Protein Assay Kit* (Pierce), según las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la cuantificación, el sobrenadante se mezcló con un volumen igual de solución de *Laemmli 2X* (BioRad) conteniendo un 5% de β-mercaptoetanol. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos y posteriormente se guardaron a -20°C hasta su uso.

10 Separación de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es una técnica utilizada para separar proteínas. La mezcla de acrilamida/bisacrilamida polimeriza fruto de una reacción de oxido-reducción, formando un entramado cuyo tamaño de poro es inversamente proporcional a su concentración. La aplicación del detergente SDS desnaturaliza las proteínas, confiriéndoles carga negativa de forma proporcional a su masa. Se añade también β-mercaptoetanol como agente reductor para la rotura de puentes disulfuro. Las proteínas migran a través de esta red cuando se aplica un campo eléctrico y se separan en función de su peso molecular.

En este trabajo se prepararon geles de acrilamida al 4% para el gel concentrador y del 10% para el gel separador, utilizando cristales separadores de 1,5 mm (BioRad). Se cargaron entre 20-40 µg de proteína en función del experimento realizado y se separaron en un sistema Mini-PROTEAN 3 (Biorad). Las muestras proteicas se mezclaron con 5% β-mercaptoetanol (Sigma) en solución *Laemmli IX*. Como marcador

de peso molecular se utilizó el *Precision Plus Protein TM Dual Color Standard* (Biorad).

11 Ensayos de electroforesis azul nativa (*Blue Native Electrophoresis, BN-PAGE*)

11.1 Obtención de *pellets* mitocondriales a partir de cíbridos mediante tratamiento con digitonina

Los cíbridos transmitocondriales se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de entre 70-80%. Las mitocondrias se aislaron de los cultivos celulares tal como se describe en (Nijtmans et al, 2002) con ligeras modificaciones. Las células se recogieron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 100 µl de PBS más 100 µl de solución de digitonina (4 mg/ml), obteniendo una concentración final en la muestra de 2 mg/ml de digitonina. Una vez homogenizada la muestra se mantuvo en hielo durante 15 minutos para disolver las membranas con agitación suave cada 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadió 1 ml de PBS frío y se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* en 1 ml de PBS frío, volviéndose a centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm. Finalmente se eliminó el sobrenadante obteniéndose un *pellet* de fracción mitocondrial enriquecida, que se conservó a –80°C hasta su utilización.

11.2 Preparación de muestras para ensayos de electroforesis azul nativa (BNE-PAGE)

Para la separación de los complejos y supercomplejos mitocondriales en condiciones nativas, los *pellets* mitocondriales obtenidos en el apartado anterior se solubilizaron en 100 µl de un tampón que contenía 1,75 M ácido 6-aminohexanoico (Sigma) y 75 mM Bis-Tris (Sigma) a pH 7,0. Se determinó la concentración de proteína utilizando el *kit Micro BCA Protein Assay* (Pierce). Posteriormente para la solubilización de los supercomplejos mitocondriales se añadió digitonina a una proporción de 4g/g (4 gramos de digitonina por gramo de proteína). El homogenado se incubó en hielo durante 15 minutos con agitación suave cada 5 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra durante 30 minutos a 13000 rpm a 4°C. Se recogió el sobrenadante, al cual se le añadió 1 µl de tampón de carga (750 mM ácido 6-amino hexanoico, 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, 5% *Serva Blue G-250* (Serva)) por cada 10 µl de sobrenadante.

11.3 Electroforesis bidimensional azul nativa

La electroforesis azul nativa (*Blue Native Electrophoresis o BN-PAGE*) es una técnica que permite separar complejos proteicos en su conformación nativa en una primera dimensión, que se lleva a cabo en condiciones no desnaturalizantes. Posteriormente, las subunidades que componen dichos complejos se pueden separar en una segunda dimensión llevada a cabo en condiciones desnaturalizantes.

La **primera dimensión (1D-BN-PAGE)** se realizó en geles separadores con un gradiente lineal del 3-13% de acrilamida/bisacrilamida (29:1, Biorad) y geles separadores al 4%, con un tampón para el gel que contenía 0,5 M 6-aminohexanoico (Sigma), 50 mM Bis-Tris (Sigma) a pH 7, utilizando separadores de 1,5 mm. Se cargaron entre 60-80 µg de proteína mitocondrial por pocillo, utilizando como ánodo el tampón A (50 mM Bis-Tris pH 7,0) y como cátodo el tampón C1 (15 mM Bis-Tris, 50 mM Tricina pH 7,0 y 0,02% *Serva Blue G-250*). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y posteriormente a 80 V hasta que el frente del azul de *coomassie* se salió del gel. Previamente, cuando el frente de electroforesis alcanzó aproximadamente la mitad del gel, se cambió el tampón C1 por el tampón C2 (15 mM Bis-Tris, 50 mM tricina pH 7,0) para lavar el exceso de azul de *coomassie* de los geles. Parte de los geles de 1D-BN-PAGE se utilizaron para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a fin de poder analizar el ensamblaje de los supercomplejos en su conformación nativa mediante inmunodetección. Otros geles se procesaron para una segunda dimensión (2D) o se utilizaron para realizar los ensayos de actividad enzimática en gel (IGA) de los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

En la electroforesis en **segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE)**, se separaron las distintas subunidades de los complejos de la cadena respiratoria en función de su peso molecular. Para ello se cortó con un bisturí cada banda del gel de 1D-BNE-PAGE y se rotó 90° en un cristal (Figura 11). La banda se incubó durante una hora con una solución desnaturalizante (1% SDS, 1% β-mercaptoetanol), añadiendo el tampón cada 15 minutos para evitar que se seque. El exceso de solución desnaturalizante se eliminó utilizando papel de filtro. Este paso es esencial pues el β-mercaptoetanol inhibe la polimerización de la acrilamida del gel separador de 2D-BN/SDS-PAGE. Posteriormente se montó el sistema de electroforesis, utilizando cristales con separadores de 0,75 mm (Bioad). El gel separador se preparó al 10% de acrilamida/

bisacrilamida y 0,1% SDS. El gel concentrador se preparó al 4% de acrilamida/ bisacrilamida con 0,1% de SDS y se añadió alrededor de la banda de 1D-BN-PAGE. Como ánodo se utilizó el tampón A-SDS (0,2 M Tris-HCl pH 8,9) y como cátodo el tampón C-SDS (0,1 M Bis-Tris, 0,1 M Tricina pH 8,2 y 0,1% SDS). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y posteriormente a 80 V hasta que el frente alcanzó el final del gel (Figura 11).

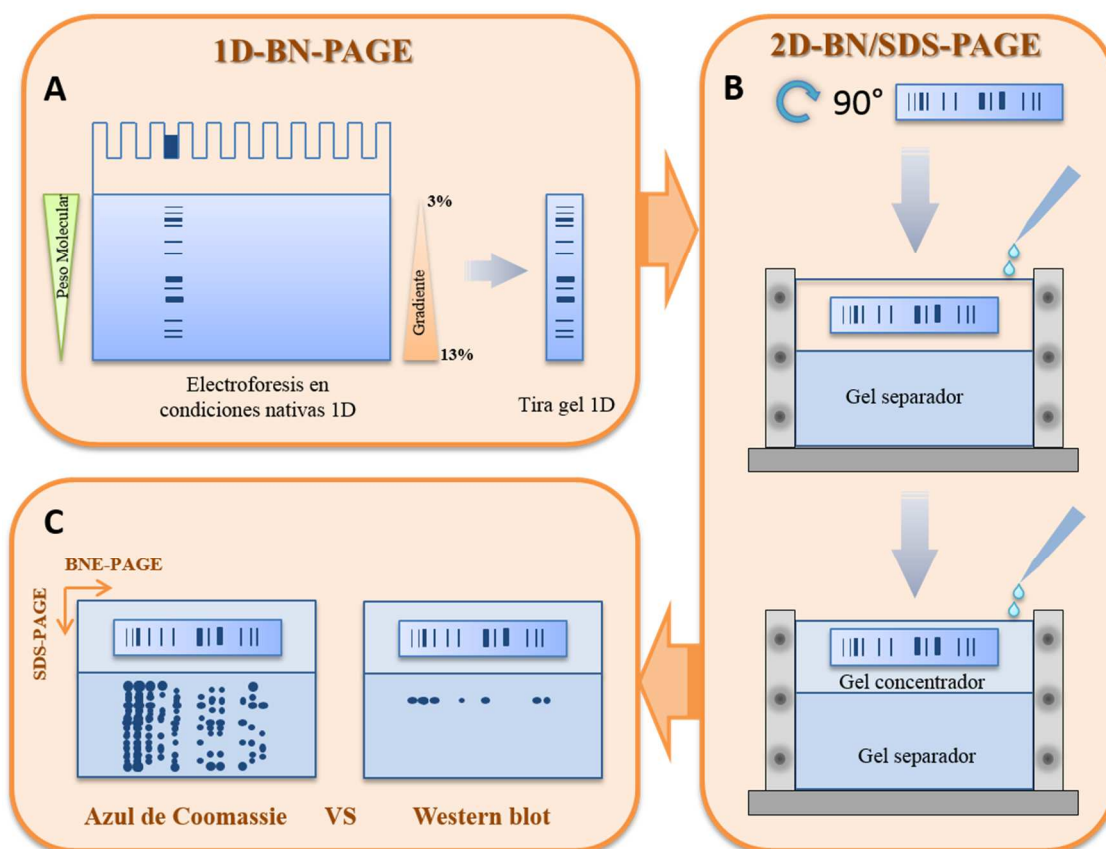


Figura 11. Electroforesis bidimensional azul nativa. (A) Los homogenados mitocondriales que contienen los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en su conformación nativa se separan mediante una primera dimensión en condiciones no desnaturalizantes (1D-BN-PAGE). (B) Preparación de la tira de 1D para la posterior separación de las subunidades individuales en segunda dimensión realizada en condiciones desnaturalizantes (2D-BN/SDS-PAGE). Para ello se corta cada carril del gel de 1D, se rota 90° y se inserta en un gel al 10% de acrilamida/ bisacrilamida. Las proteínas se separan en el gel separador en función de su peso molecular. (C) Principio de la **segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE)** llevada a cabo en condiciones desnaturalizantes. Esquema de subcomplejos proteicos hipotéticos que se pueden observar en 2D-BN/SDS-PAGE utilizando la tinción con azul de *coomassie* o la técnica de *Western-blot*. Las flechas indican la dirección de la electroforesis en la primera y segunda dimensión.

11.4 Ensayos de actividad en gel (*IGA: In Gel Activity Assay*)

Se llevaron a cabo una vez completada la electroforesis de geles de BN-PAGE. Para analizar la **actividad en gel del complejo I** los geles se incubaron entre 2-4 horas a temperatura ambiente con una solución de 2 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mg/ml NADH y 2,5 mg/ml azul de nitrotetrazolium (NTB, Sigma). Los geles se lavaron en agua destilada y se escanearon.

Para analizar la **actividad en gel del complejo IV** los geles se incubaron durante 48 horas a 37°C en agitación, con una solución de 10 mg de 3,3'-tetraclorito de diaminobencidina (DAB, Sigma), 1 nM catalasa (Sigma), 20 mg citocromo c (Sigma) y 1,5 g sacarosa (Sigma) disueltos en 18 ml de 0,05 M tampón fosfato a pH 7,4. Después de la incubación, los geles se lavaron y se escanearon.

12 Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa e inmunodetección directa (*Western-blot*)

Una vez completada la electroforesis, se eliminó la fase concentradora del gel, y la fase separadora se mantuvo en un tampón de transferencia que contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol y 0.02 % SDS (pH 8.2) durante 15 minutos. Al mismo tiempo las membranas de nitrocelulosa PROTAN® (Schleider & Schuell), utilizadas para la transferencia, se equilibraron en el mismo tampón de transferencia.

Las proteínas del gel se transfirieron en un sistema de transferencia *MiniPROTEAN® 3 cell* (Biorad) a 30 V a temperatura ambiente durante 15 horas. Posteriormente las membranas se bloquearon durante 14-16 horas con una solución de PBS (tampón fosfato que contiene 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PHO₄ a pH 7,4) con Tween-20 al 0.1% y 5% de leche desnatada a 4°C. Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos primarios que reconocen diferentes subunidades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en las condiciones de dilución y tiempo establecidas para cada uno de ellos (Tabla 1). Las membranas se lavaron tres veces con la solución de PBS-Tween-20 al 0.1% durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 2) durante 1 hora y media a temperatura ambiente. Cada membrana se volvió a lavar tres veces con PBS-Tween-20 al 0.1% durante 10 minutos. Como reactivo de revelado se utilizó el kit *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham). La cuantificación de la

señal se realizó mediante el programa de análisis de imágenes *Image J 1.46o* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

13 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en los análisis de *Western-blot* (apartado 10) y *BN-PAGE* (apartado 11) aparecen descritos en la Tabla 1. En la Tabla 2, aparecen los anticuerpos secundarios utilizados. En estas tablas también se indican las diluciones de uso, además de las casas comerciales donde fueron adquiridos. Todos los anticuerpos se diluyeron en solución PBS-Tween-20 al 0.1% con 2,5% de leche desnatada en polvo.

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en este trabajo

| ANTICUERPO | PESO MOLECULAR | ORIGEN | FABRICANTE | UTILIDAD | DILUCIÓN |
|------------|----------------|--------|------------|----------|----------|
| NDUFV1 | 50,8 kDa | Conejo | Sigma | BNE | 1:1000 |
| NDUFV1 | 50,8 kDa | Ratón | Sigma | BNE | 1:1000 |
| NDUFS1 | 79,5 kDa | Conejo | Genetex | BNE | 1:1000 |
| NDUFS2 | 52,5 kDa | Ratón | Abcam | BNE | 1:2000 |
| NDUFS4 | 20,1 kDa | Ratón | Abcam | BNE | 1:1000 |
| NDUFA9 | 42,5 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:1000 |
| SDHA | 72 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:1000 |
| CORE2 | 52,4 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:2000 |
| RISP | 29,7 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:1000 |
| COX1 | 57 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:1000 |
| COX2 | 25,6 kDa | Ratón | Abcam | BNE | 1:1000 |
| COX3 | 29,9 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:1000 |
| COX4 | 19,6 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:1000 |
| COX5A | 16,8 kDa | Ratón | Abcam | BNE | 1:2000 |
| COX6C | 8,8 kDa | Ratón | Abcam | WB/BNE | 1:1000 |

Tabla 1. En la tabla se indica la proteína que reconoce el anticuerpo, el peso molecular según la base de datos Genecards, el origen animal del anticuerpo, la compañía comercial, la utilidad experimental y la dilución empleada. WB, *Western-blot* y BNE (Blue-Native).

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en este trabajo

| ANTICUERPO | ORIGEN | ACOPLADO A | FABRICANTE | UTILIDAD | DILUCIÓN |
|------------------------------------|--------|------------|---------------------|----------|----------|
| GAMPO Anti-IgG de ratón | Cabra | Peroxidasa | Molecular Probes | BNE/WB | 1:2000 |
| GARPO Anti-IgG de conejo | Cabra | Peroxidasa | Molecular Probes | BNE/WB | 1:2000 |

Tabla 2. En la tabla se indica el anticuerpo, el origen animal del anticuerpo, molécula que lleva acoplada, la compañía comercial donde fue adquirido, así como la utilidad experimental que se les ha dado en esta tesis y la dilución empleada. WB, *Western-blot*; y BNE (*Blue-Native*).

14 Medidas espectrofotométricas de la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

La actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial se midió en homogenados de cultivos celulares. El extracto celular se preparó a partir de aproximadamente 15 millones de células que se resuspendieron en 20 mM tampón fosfato a pH 7,0. A continuación se lisaron mediante sonicación (3 ciclos de 10 segundos a una amplitud de 15 micrones), y se midió la concentración de proteína mediante el *kit MicroBCA Protein Assay* (Pierce). Se midió la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial mediante espectrofotometría según técnicas descritas previamente (DiMauro et al 1987, Martínez et al 2001) con ligeras modificaciones, usando un espectrofotómetro DU-650 (Beckman) con el *software* incorporado para la medida de las reacciones cinéticas.

La actividad del complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) se determinó mediante la oxidación del NADH a 340 nm. El medio de reacción contenía 20 mM tampón fosfato pH 8,0, 0,2 mM NADH, 1 mM NaN₃, 0,1% de BSA-EDTA y 100 μM CoQ₁. La actividad NADH deshidrogenasa se inhibió al 100% tras añadir 5 μM de rotenona, quedando un 20% de actividad residual perteneciente a otras deshidrogenasas. La actividad del complejo I sensible a rotenona se calculó mediante la siguiente ecuación: $\Delta (\text{Abs/min}) = \text{Abs/min con CoQ1} - \text{Abs/min con rotenona}$.

Los valores obtenidos se expresaron relativos a la actividad citrato sintasa, enzima de matriz mitocondrial frecuentemente utilizada como marcador intracelular de masa mitocondrial. La actividad citrato sintasa se cuantificó en función del cambio en la absorbancia a 412 nm por minuto producida por la reacción de 100 μM de DNTB

(ácido 5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico) con 100 μ M de coenzima A libre, formada por la condensación del acetyl-CoA (350 μ g/ml) con 0,5 mM de oxalacetato, en una solución tampón 75 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 0,1 % de Triton X-100. Para el cálculo de la actividad citrato sintasa se empleó la siguiente fórmula: Δ (Abs/min)= Abs/min con oxalacetato. Los resultados también se normalizaron respecto a la concentración de proteínas del extracto celular. La temperatura de incubación fue de 30°C para todas las reacciones y el volumen final en todas ellas fue de 1 ml, siendo realizado cada ensayo por triplicado.

RESULTADOS

1. ENSAMBLAJE DE LOS SUPERCOMPLEJOS MITOCONDRIALES EN MODELOS CELULARES CONTROL.

1.1 Distribución de las subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial en complejos y supercomplejos.

En primer lugar se analizó la distribución relativa de distintas subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) entre las diferentes estructuras en las que se pueden localizar, es decir, supercomplejos o respirasomas formados por la asociación de los complejos I, III y IV ($I+III_2+IV_{1-4}$) (SC), supercomplejos intermedios formados por la asociación de los complejos I y III ($I+III_2$) o de los complejos III y IV (III_2+IV), y los complejos libres I, III y IV, en tres líneas celulares control humanas, la línea de osteosarcoma 143B206, la línea HEK293 de células embrionarias de riñón y un cíbrido transmitocondrial control (CC1). El análisis por electroforesis azul nativa en 1D y 2D en combinación con Western-blot mostró patrones similares de distribución de las subunidades de CRM analizadas entre las tres líneas celulares control (Figuras 1A y 1B). El nivel de resolución de los geles no permitió la distinción entre el supercomplejo $I+III_2$ y el respirasoma o supercomplejo $I+III_2+IV_{1-4}$, por lo que ambos se incluyeron en un único grupo denominado $I+III_2+IV_n$ o SC. A continuación, se cuantificaron las señales obtenidas de los distintos anticuerpos en tres análisis independientes para cada línea celular y se expresaron como porcentaje con respecto a la señal total obtenida de cada anticuerpo (Tabla 1). Entre el 65% y el 97% de las señales correspondientes a las subunidades NDUFA9, NDUFS2 y NDUFS4 del complejo I se localizaron en supercomplejos con un peso molecular mayor de ~1500 kDa (SC). Además, las subunidades NDUFA9 y NDUFS2 colocalizaron en un punto (indicado como CI*) que correspondía a un subcomplejo estable de ~830 kDa. Las subunidades NDUFA9, NDUFS2 y NDUFS4 también se detectaron a niveles reducidos en bandas de menor peso molecular, cuyos patrones se asemejan a los subcomplejos del complejo I descritos previamente (Antonicka et al, 2003; Lazarou et al, 2007; Ugalde et al, 2004; Vogel et al, 2007a). Con respecto a las subunidades del complejo III, el ~50% de las señales de CORE2 y de la proteína hierro azufre de Rieske (RISP) se detectaron en los supercomplejos $I+III_2+IV_n$, el ~40% en el homodímero del complejo III y entre ~5-10% en el supercomplejo intermedio III_2+IV . En contraste, tan solo el ~30% de las señales correspondientes a las subunidades COX1 y COX5A del complejo IV se detectaron en

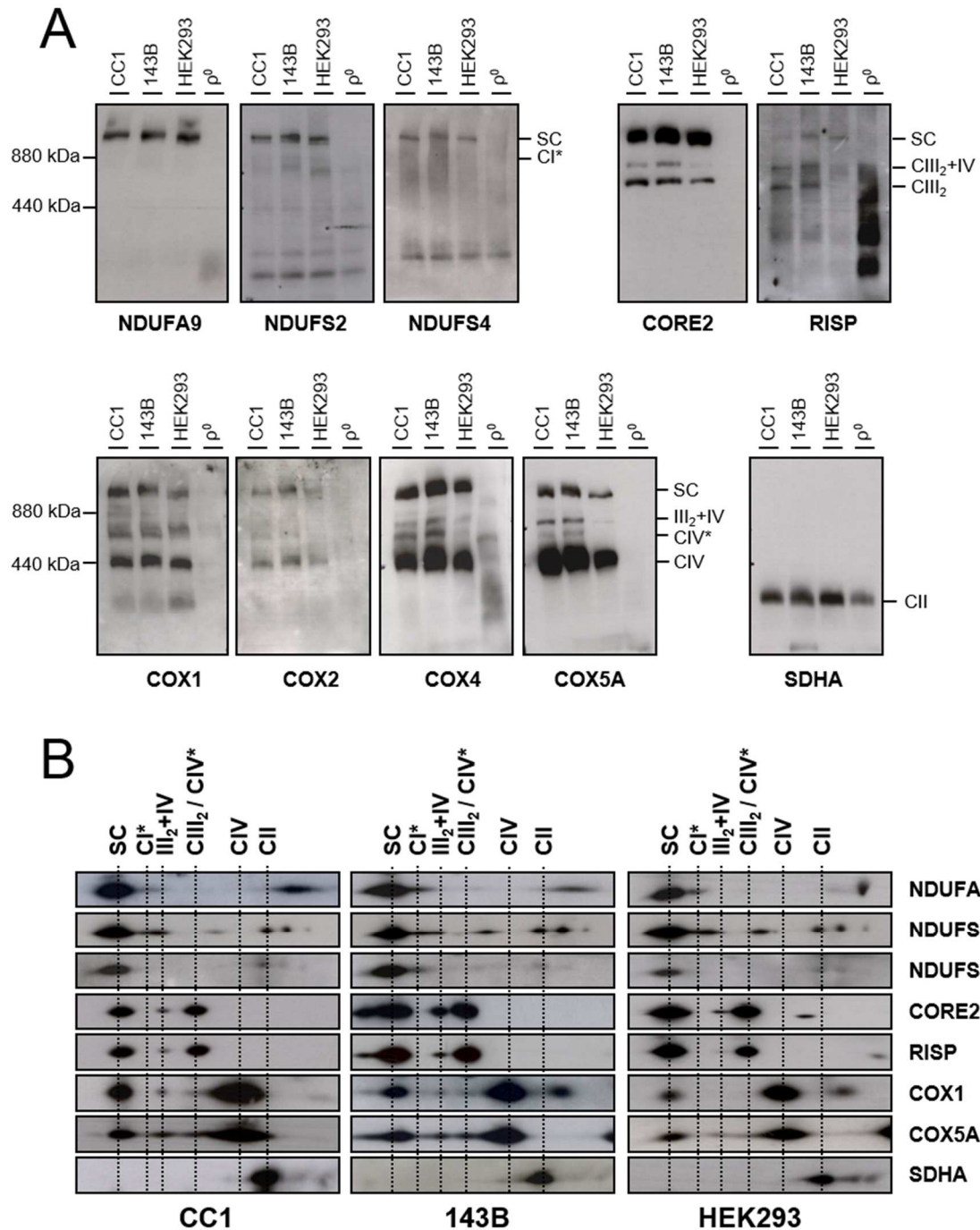


Figura 1. Distribución de las subunidades OXPHOS entre complejos y supercomplejos mitocondriales en líneas celulares control humanas. Se analizaron 60 μ g de proteínas mitocondriales mediante análisis de electroforesis azul nativa en combinación con *Western-blot* utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades OXPHOS indicadas. (A) Análisis de los niveles estacionarios de los complejos y SC mitocondriales mediante 1D-BN-PAGE. A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. (B) Patrones de distribución de las subunidades OXPHOS en geles de 2D-BN/SDS-PAGE. CC1, híbrido transmitocondrial control; 143B, línea celular de osteosarcoma 143B-206 TK⁻; HEK293, células embrionarias humanas de riñón HEK293; σ^0 , línea celular *rho zero*; SC, supercomplejos que contienen a los complejos I, III y IV; CI*, intermedio de 830 kDa del complejo I; CII, complejo II; CIII₂, dímero del complejo III; CIV, complejo IV; CIV*, posible dímero del complejo IV; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV.

los supercomplejos I+III₂+IV_n, mientras que las señales mayoritarias (~60-70%) se detectaron en el complejo IV libre y solo entre ~1-3% en el supercomplejo III₂+IV. La señal correspondiente a la subunidad SDHA del complejo II (CII) apareció principalmente en forma libre, no colocalizando con los supercomplejos. Estos resultados son comparables a los obtenidos previamente por otros grupos en tejidos y líneas celulares humanas (Kovářová et al, 2013; Dudkina et al, 2011; Lenaz and Genova, 2010; Muster et al, 2010; Quarato et al, 2011; Schafer et al, 2006; Schagger and Pfeiffer, 2000, 2001).

| Subunidad | CI* | CIII ₂ | CIV | III ₂ +IV | SC |
|-----------|------|-------------------|------|----------------------|------|
| NDUFA9 | 8±2 | np | np | np | 82±9 |
| NDUFS2 | 14±5 | np | np | np | 65±7 |
| NDUFS4 | 3±3 | np | np | np | 97±3 |
| CORE2 | np | 37±4 | np | 10±4 | 55±5 |
| RISP | np | 42±8 | np | 6±1 | 51±5 |
| COX5A | np | np | 69±6 | 3±2 | 27±6 |
| COX1 | np | np | 63±7 | 1±1 | 36±6 |

Tabla 1. Valores derivados del análisis densitométrico de las señales de subunidades OXPHOS distribuidas entre complejos y supercomplejos mitocondriales. Para calcular los niveles relativos de las subunidades de CRM presentes tanto en los complejos libres como en los supercomplejos, se cuantificaron las señales obtenidas de al menos tres experimentos independientes de 2D-BN/SDS-PAGE para cada línea celular. Los valores se expresaron como porcentaje de la señal total obtenida para cada anticuerpo y se indicaron como media ± desviación estándar. SC, supercomplejo que contiene a los complejos I, III y IV; CI*, intermediario de 830 kDa del complejo I; CIII₂, dímero de complejo III; CIV, complejo IV; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; np, no presente.

Curiosamente, tanto los niveles de la subunidad RISP del complejo III como los de la subunidad COX1 del complejo IV se encontraban reducidos un ~50% en el supercomplejo III₂+IV respecto a otras subunidades de dichos complejos, como CORE2 y COX5A, respectivamente. De igual forma, los niveles de RISP fueron un ~20% menos abundantes en el supercomplejo I+III₂+IV_n que los de la subunidad CORE2, mientras que los niveles de COX1 en dichas estructuras fueron un ~25% más abundantes que los de COX5A. De forma recíproca, los niveles de RISP en el complejo III fueron un ~20% mayores de los de CORE2, mientras que los niveles de COX1 en el complejo IV libre fueron un ~10% menores que los de COX5A. Estos resultados sugieren que podrían

existir diferencias estequiométricas de las subunidades de un mismo complejo de CRM entre las diferentes formas estructurales de los complejos y supercomplejos.

1.2 Efectos del tratamiento con doxiciclina sobre los niveles de ADNmt y la traducción mitocondrial.

Las variaciones observadas en el patrón de distribución de distintas subunidades del mismo complejo de la CRM podrían explicarse bien por diferencias en las cinéticas de ensamblaje, o bien por variaciones en la estabilidad de cada subunidad dentro de los complejos individuales y los supercomplejos. Para discriminar entre estas dos posibilidades, las líneas celulares 143B y el híbrido control CC1 se cultivaron durante 6 días en presencia de 15 µg/ml de doxiciclina, un inhibidor reversible de la traducción mitocondrial. Dicho tratamiento genera una depleción específica de las subunidades codificadas por el ADNmt, las cuales se encuentran tanto en los complejos individuales I, III y IV como en los supercomplejos (Pello et al, 2008). Las células HEK293 se cultivaron durante 8 días en dicho medio, debido a que el tratamiento de 6 días con doxiciclina no alcanzó los niveles de inhibición obtenidos en las líneas celulares 143B y CC1.

En primer lugar, se analizó en células 143B y CC1 si la concentración de doxiciclina utilizada para la inhibición reversible de la traducción mitocondrial afectaba al número de copias del ADNmt. Mediante análisis de PCR a tiempo real se observó una disminución del 35-40% en el contenido relativo del ADNmt de las células tratadas durante 6 días con doxiciclina, el cual recobró niveles normales a las 96h después de retirar el tratamiento (Figura 2). Además, el

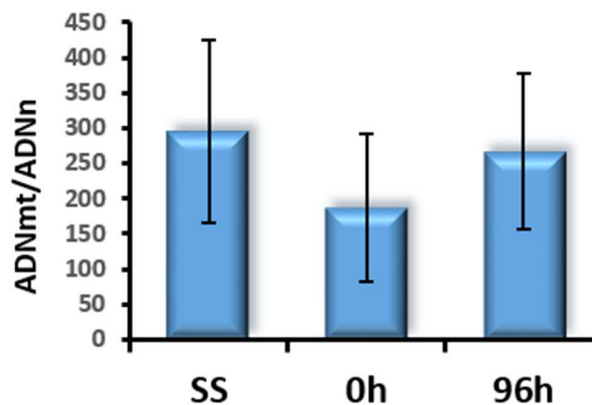


Figura 2. Niveles relativos de ADNmt en células 143B y híbridos control CC1 tratados con doxiciclina. Se realizó una cuantificación relativa del número de copias de ADNmt frente al ADNn mediante PCR a tiempo real en las líneas celulares 143B y CC1. SS (estado estacionario). 0h (células cultivadas durante 6 días con doxiciclina). 96h (células recogidas 96 horas después de retirar la doxiciclina del medio de cultivo).

tratamiento con doxiciclina inhibía de forma específica la traducción mitocondrial (Figuras 3A y 3B) sin afectar a la traducción citoplasmática (Figura 3C), aunque dicha

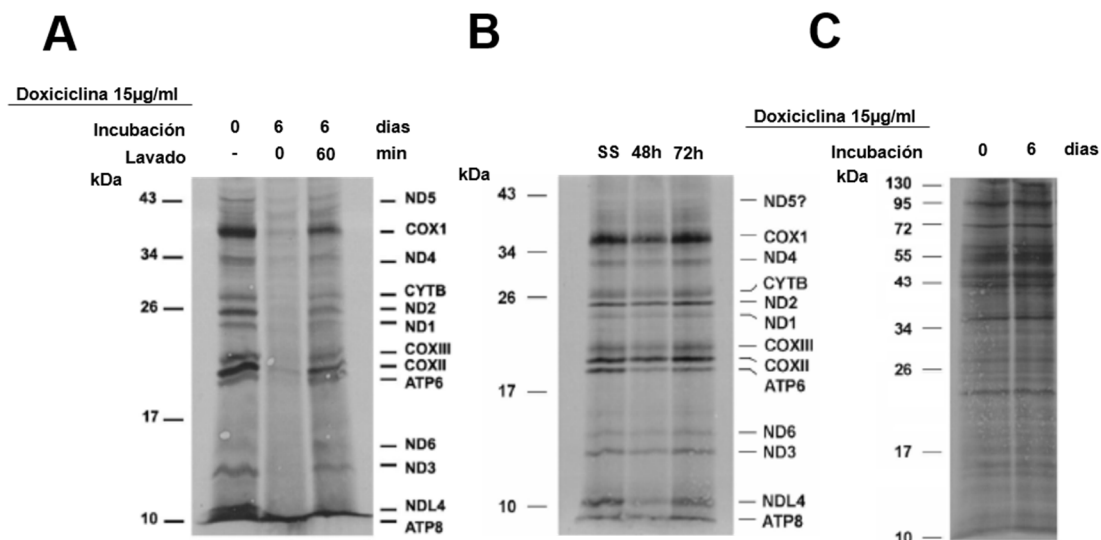


Figura 3. Efecto del tratamiento con doxyciclina sobre la inhibición de la traducción mitocondrial. (A) Las células 143B se trataron durante 6 días con 15 µg/ml de doxyciclina. Después de retirarse la doxyciclina del medio de cultivo se realizó un marcaje de proteínas mitocondriales con metionina- S^{35} y emetina durante 60 minutos. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 17,5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su posterior revelado mediante película autoradiográfica (B) Al igual que en el panel A, exceptuando que las proteínas mitocondriales se marcaron radioactivamente a las 48 y 72 horas después de retirar la doxyciclina. SS, células sin tratar. (C) Síntesis de proteínas citoplasmáticas en células 143B sin tratar (0 días) o tratadas durante 6 días con 15 µg/ml de doxyciclina. Se realizó un marcaje de proteínas citoplasmáticas con metionina- S^{35} durante 60 minutos. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 17,5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su posterior revelado mediante película autoradiográfica.

inhibición no fue total ya que las células mostraron entre un 10-15% de síntesis residual de polipéptidos mitocondriales a los 6 días de tratamiento con doxyciclina (Figura 3A). La disminución temporal en los niveles de ADNmt no pareció afectar a la traducción mitocondrial, ya que la expresión de proteínas mitocondriales alcanzó niveles normales a las 72 horas tras el tratamiento con doxyciclina (Figura 3B).

Para corroborar que el tratamiento de 6 días con doxyciclina no afectaba a la traducción citoplasmática, se analizaron los niveles de distintas subunidades OXPHOS nucleares mediante *Western-blot* en células 143B recogidas a diferentes tiempos (0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas) post-tratamiento. En concreto, se analizaron los niveles de la subunidad NDUFA9 del complejo I, de las subunidades CORE2 y RISP del complejo III, de la subunidad COX5A del complejo IV y de la subunidad SDHA del complejo II, que además se utilizó como control de carga. No se observaron diferencias significativas en los niveles estacionarios de dichas subunidades entre las células tratadas (0, 6, 15,

24, 48, 72 y 96 horas) y sin tratar (SS), lo que sugiere que el tratamiento con doxiciclina no afecta a la traducción de dichas proteínas en el citoplasma (Figura 4).

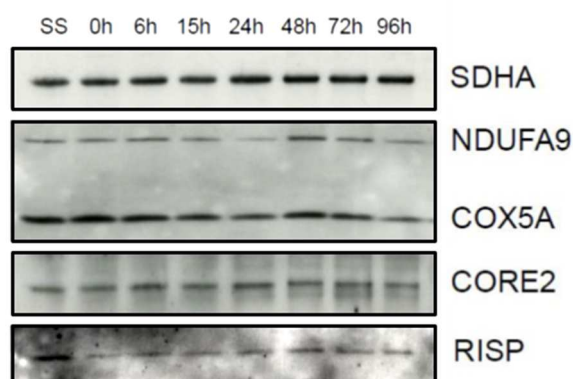


Figura 4. Análisis de los niveles de subunidades de cadena respiratoria mediante *Western-blot*. Se analizaron 30µg de proteína procedente de lisados totales de células 143B sin tratar (SS) o tratadas durante 6 días con doxiciclina (0h) e incubadas posteriormente en medio DMEM fresco durante los tiempos indicados (en horas). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se incubaron con anticuerpos que reconocen las subunidades indicadas.

1.3 Efecto del tratamiento con doxiciclina sobre el ensamblaje de los complejos y supercomplejos de cadena respiratoria.

Se han postulado dos posibles hipótesis acerca de la biogénesis de los supercomplejos mitocondriales: la primera sostiene que el ensamblaje de los supercomplejos se originaría mediante la asociación de los complejos individuales previamente formados y activos (Acín-Perez et al, 2008). Sin embargo, numerosos estudios con muestras de pacientes y modelos animales con mutaciones deletéreas en distintas subunidades OXPHOS sugerían que el ensamblaje de los supercomplejos podría producirse mediante la asociación de intermediarios parcialmente ensamblados de los complejos de la CRM (Mick et al, 2007; Lazarou, et al 2009; Fernandez-Vizarra et al., 2009; Calvaruso et al, 2011). Para discriminar entre ambas hipótesis, podría partirse de la premisa de que si el ensamblaje de los supercomplejos se produce por la asociación de los complejos individuales previamente ensamblados, todas las subunidades de un mismo complejo deberían incorporarse en paralelo en los supercomplejos, obteniéndose cinéticas de ensamblaje similares para cada una de las subunidades. Por el contrario, si el ensamblaje de los supercomplejos se produjera por la asociación de subcomplejos o intermediarios parcialmente ensamblados, las subunidades de un mismo complejo se incorporarían a distintos tiempos en estas estructuras, obteniéndose cinéticas de ensamblaje diferentes para cada subunidad.

A fin de confirmar una u otra hipótesis, se analizó la síntesis *de novo* de los complejos de la CRM y su asociación en los supercomplejos. Para ello, las células 143B, CC1 y HEK293 se sometieron al tratamiento con 15 µg/ml de doxyciclina durante 6 días y las células se recolectaron a diferentes tiempos (0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas) después de retirar la doxyciclina del medio de cultivo. Las mitocondrias se solubilizaron mediante tratamiento con digitonina, los complejos individuales y supercomplejos mitocondriales se separaron mediante BN-PAGE y posteriormente las membranas se analizaron por *Western-blot* (Figura 5). De acuerdo con la síntesis residual de subunidades codificadas por el ADNmt (Figura 3), a los 6-8 días de tratamiento con doxyciclina (tiempo 0h) se detectó una reducción parcial (~80%) de los niveles de los

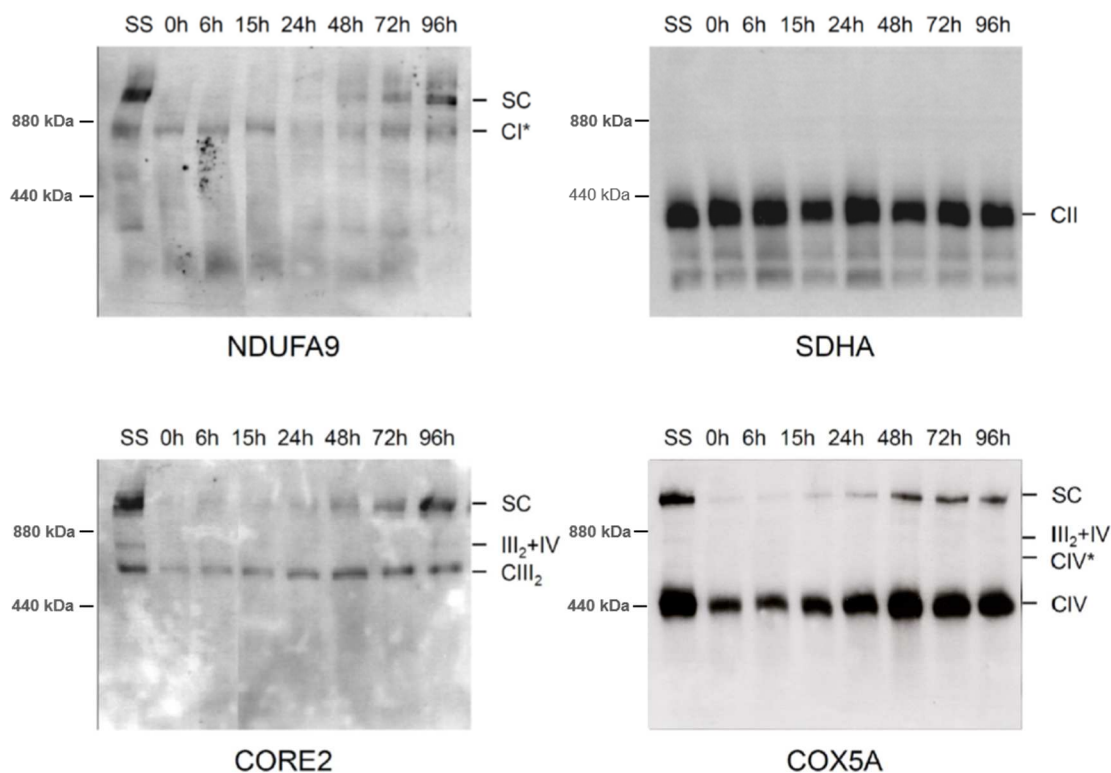


Figura 5. Análisis mediante BN-PAGE de los complejos y supercomplejos de la CRM en células 143B tratadas con doxyciclina. Las células 143B se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxyciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial mediante la sustitución del medio por un medio de cultivo normal, se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 60 µg de proteínas mitocondriales en geles BN-PAGE con un gradiente del 3-13% de acrilamida/bisacrilamida. Posteriormente se realizó un ensayo de *Western-blot* contra las subunidades OXPHOS indicadas. SC, supercomplejos que contienen a los complejos I, III y IV; CI*, intermediario de 830 kDa del complejo I; CII, complejo II; CIII₂, dímero del complejo III; CIV, complejo IV; CIV*, posible dímero del complejo IV; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV. A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. Se obtuvieron resultados comparables del análisis de las células CC1 y HEK293.

complejos III y IV libres en las tres líneas celulares, así como la pérdida de dichos complejos y del complejo I en los supercomplejos mitocondriales respecto a las muestras no tratadas (SS). Por tanto, a tiempo 0 horas la síntesis residual de proteínas mitocondriales no pareció alcanzar niveles suficientemente altos para permitir la formación de los supercomplejos. Además, la subunidad NDUFA9 del complejo I se acumuló en un subcomplejo de 830 kDa que se ha descrito como un intermediario de ensamblaje del complejo I carente del módulo NADH deshidrogenasa (Lazarou et al 2007; Ugalde et al 2004). Dicha señal disminuyó en paralelo al aumento de la subunidad NDUFA9 en los supercomplejos, que alcanzó los niveles estacionarios a las 96 horas. Respecto a las subunidades CORE2 del complejo III y COX5A del complejo IV, dichas señales se detectaron inicialmente en sus correspondientes complejos individuales. A las 15-24 horas del tratamiento, ambas subunidades comenzaron a observarse en los supercomplejos I+III₂+IV_n y en último término, en el supercomplejo III₂+IV a las 96 horas tras el tratamiento con doxiciclina. Estos resultados apoyan estudios previos que sugieren que para la formación del respirasoma se requieren unos niveles mínimos de los complejos III y IV individuales (D'Aurelio et al, 2006). Por otro lado, los niveles del complejo II no se vieron afectados por el tratamiento con doxiciclina, tal como se esperaba ya que este complejo carece de subunidades codificadas por el ADNmt (Figura 5). No se observó la colocalización de la subunidad SDHA del complejo II con los supercomplejos.

1.4 Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo I en los supercomplejos mitocondriales.

La biogénesis del complejo I de mamíferos consiste en una ruta semisecuencial en la cual es necesario el pre-ensamblaje y asociación de módulos funcionales conservados evolutivamente, cada uno de los cuales contiene distintas subunidades del complejo (Ugalde et al, 2004; Vogel et al, 2007; Perales-Clemente et al, 2010; Mimaki et al, 2012; Hoefs et al, 2012). Para analizar el ensamblaje del complejo I y su incorporación en supercomplejos, se separaron mediante 2D-BN/SDS-PAGE las fracciones mitocondriales de las células 143B, CC1 y HEK293 tratadas con doxiciclina y las membranas se incubaron con anticuerpos que reconocen subunidades pertenecientes a distintos módulos funcionales que participan en diferentes estadios del ensamblaje del complejo I (Figura 6) (Mckenzie and Ryan, 2010). La subunidad NDUFS2 forma parte del brazo periférico (módulo Q) y se incorpora al complejo I en

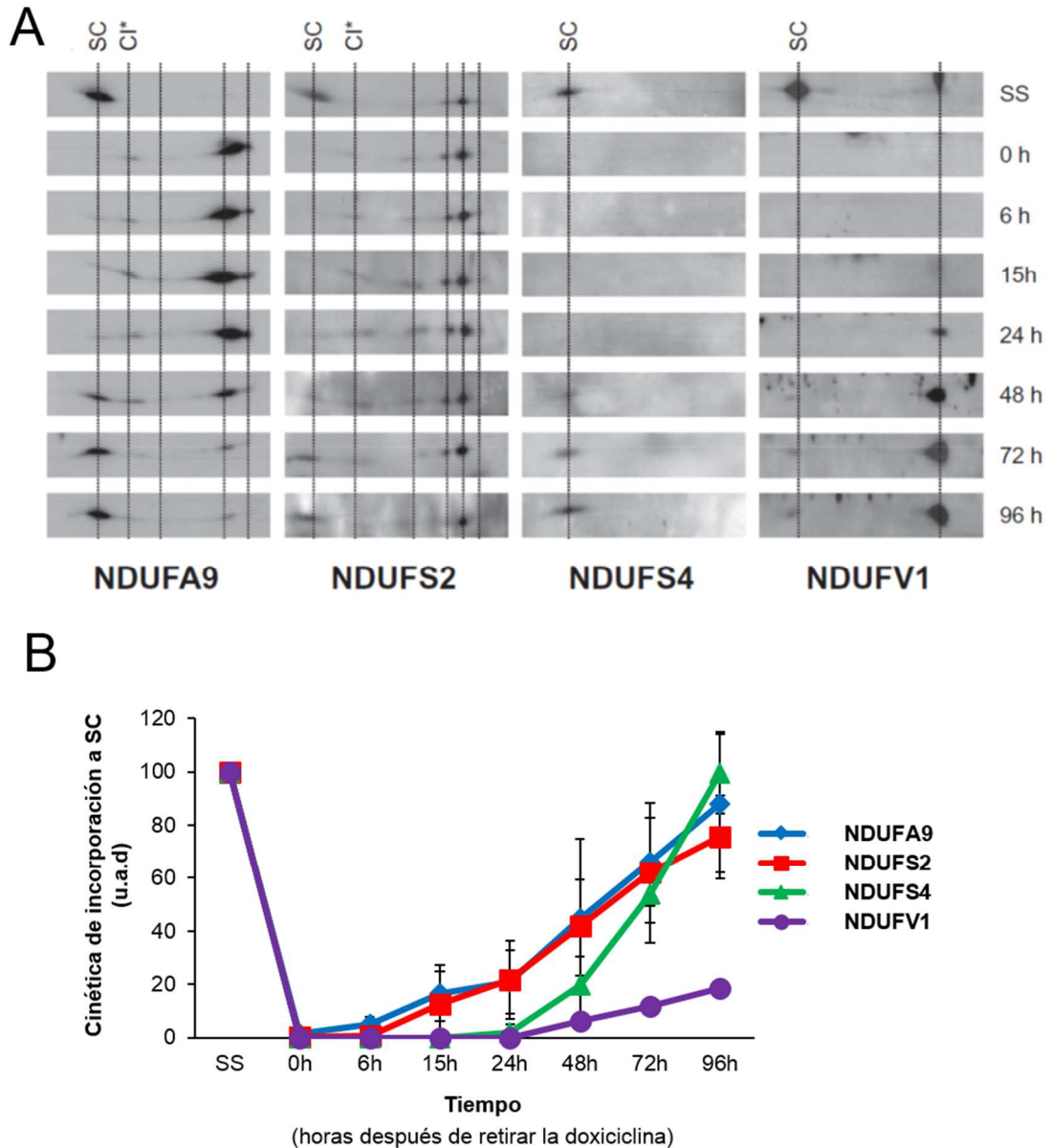


Figura 6. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo I a los supercomplejos. (A) Las células 143B se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial mediante la sustitución del medio por un medio de cultivo normal, se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9, NDUF2, NDUF4 y NDUFV1 (monoclonal) del complejo I. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; CI*, subcomplejo de 830 kDa del complejo I. SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en células 143B sin tratar con doxiciclina. (B) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot* de al menos dos experimentos independientes para cada línea celular (143B, CC1 y HEK293), se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar de todas las medidas realizadas en las tres líneas celulares. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d).

una etapa temprana; la subunidad NDUF9 parece estar localizada en la zona de unión entre el brazo periférico y el brazo de membrana (módulo P) y se incorpora al complejo I en una etapa intermedia; y finalmente, las subunidades NDUF4 y NDUFV1 forman parte del módulo NADH deshidrogenasa o módulo catalítico N, localizado en el brazo periférico, las cuales se incorporan como últimos pasos del ensamblaje del complejo I (Lazarou et al 2007).

Ninguna de las subunidades analizadas se detectó en el supercomplejo I+III₂+IV_n en las células crecidas durante 6-8 días en presencia de doxiciclina (Figura 6, tiempo 0h). A este tiempo (0h) se acumularon cantidades residuales de las subunidades NDUF9 y NDUF2 en diferentes subcomplejos previamente descritos como intermediarios de ensamblaje del complejo I (Figuras 6A) (Ugalde et al 2004; Vogel et al 2007a). Uno de estos subcomplejos (indicado como CI*) correspondería al intermediario estable de ~830 kDa que carece de las subunidades del módulo catalítico N, NDUF4 y NDUFV1. Dicho intermediario se suele acumular en células de pacientes con mutaciones patogénicas en genes que codifican subunidades del módulo N, como *NDUF1*, *NDUF4* y *NDUFV1* (Hoefs et al 2010; Lazarou et al 2007; Ugalde et al 2004; Vogel et al 2007b). Al reiniciarse la traducción de proteínas mitocondriales, el subcomplejo CI* se desplazó hacia la posición de los supercomplejos de alto peso molecular I+III₂ y I+III₂+IV₁₋₄ (SC), disminuyendo sus niveles relativos a las 72-96 horas después de retirar la doxiciclina, lo que sugiere que es un intermediario en la síntesis de los supercomplejos. Las subunidades NDUF2 y NDUF9 comenzaron a detectarse en los supercomplejos a las 15-24 horas tras el tratamiento con doxiciclina y a las 96 horas alcanzaron niveles cercanos a los del estado estacionario de las células sin tratar (SS) (figuras 6B).

Las subunidades de ensamblaje tardío NDUF4 y NDUFV1 aparecieron en los supercomplejos entre las 48-72 horas después de retirar el antibiótico, sugiriendo que la incorporación de estas dos subunidades en dichas estructuras estaría retrasada respecto a la de las subunidades NDUF2 y NDUF9. La subunidad NDUF4 alcanzó los niveles estacionarios a las 96 horas del tratamiento, lo que sugiere que a pesar de su retraso inicial, esta subunidad se integraría rápidamente en los supercomplejos (Figuras 6B). Sin embargo, la subunidad NDUFV1 mostró a las 96 horas niveles muy inferiores a los del estado estacionario, lo que indicaría un marcado retraso en su incorporación en los supercomplejos. Estos resultados sugieren que en estadios tempranos del ensamblaje

de los supercomplejos, el complejo I se encontraría parcialmente ensamblado e inactivo, ya que carecería de parte de las subunidades que forman el módulo catalítico N. En la Figura 6B se muestra una estimación cuantitativa de las cinéticas de ensamblaje para las diferentes subunidades del complejo I.

1.5 Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo III en los supercomplejos mitocondriales.

Se desconoce el proceso de biosíntesis del complejo III en mamíferos, pero se ha propuesto un modelo de ensamblaje de dicho complejo en levaduras (Smith et al., 2012). En base a este modelo, se analizó la integración de dos subunidades del complejo III tanto en su forma de homodímero como en los supercomplejos $\text{III}_2\text{+IV}$ y $\text{I+III}_2\text{+IV}_{1-4}$: la subunidad accesoria CORE2, que se integra en un estadio temprano del ensamblaje y la subunidad catalítica RISP, que se integra en uno de los últimos pasos del ensamblaje del complejo III (Atkinson *et al* 2011) (Figura 7). Tras tratar las células 143B, CC1 y HEK293 durante 6-8 días con doxiciclina (tiempo 0h), se observó una reducción del ~80-90% en los niveles de ambas subunidades en el dímero del complejo III (CIII_2) respecto a las células sin tratar (SS), sin detectarse la presencia de estas dos subunidades en los supercomplejos (SC) (Figura 7A, 0h). Una vez restaurada la traducción de proteínas codificadas por el ADNmt, en primer lugar se observó un aumento gradual en los niveles de ambas subunidades en el dímero del complejo III (Figura 8). La subunidad CORE2 alcanzó los niveles estacionarios en el complejo III a las 24-48 horas del tratamiento con doxiciclina, mientras que la subunidad RISP los alcanzó a las 72-96 horas. Estos datos confirman que al igual que en levaduras en células control humanas la subunidad RISP también se inserta en el complejo III en estadios tardíos. Respecto a la aparición de estas subunidades en los supercomplejos $\text{III}_2\text{+IV}$ y $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$, CORE2 comenzó a detectarse a niveles bajos en ambas estructuras a las 24 horas después del tratamiento con doxiciclina, alcanzando los niveles estacionarios a las 96 horas (Figuras 7 y 8). Sin embargo, se observó un retraso en la incorporación de la subunidad RISP tanto en el supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ como en el $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$ respecto a la subunidad CORE2. RISP apareció en los supercomplejos $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$ a las 48 horas después del tratamiento con doxiciclina pero sin alcanzar los niveles estacionarios a las 96 horas, siendo dichos niveles de entre ~30-50% respecto a las células sin tratar (Figuras 7 y 8). Sorprendentemente, RISP se comenzó a detectar en el supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ a las 72-96 horas tras la retirada de la doxiciclina, sugiriendo que el ensamblaje completo de

dicho supercomplejo ocurriría de forma posterior a la formación del supercomplejo $I+III_2+IV_n$. Estos resultados sugieren que en los estadios tempranos del ensamblaje de los supercomplejos, el complejo III no se encontraría completamente ensamblado ni activo, ya que carecería al menos de la subunidad catalítica RISP.

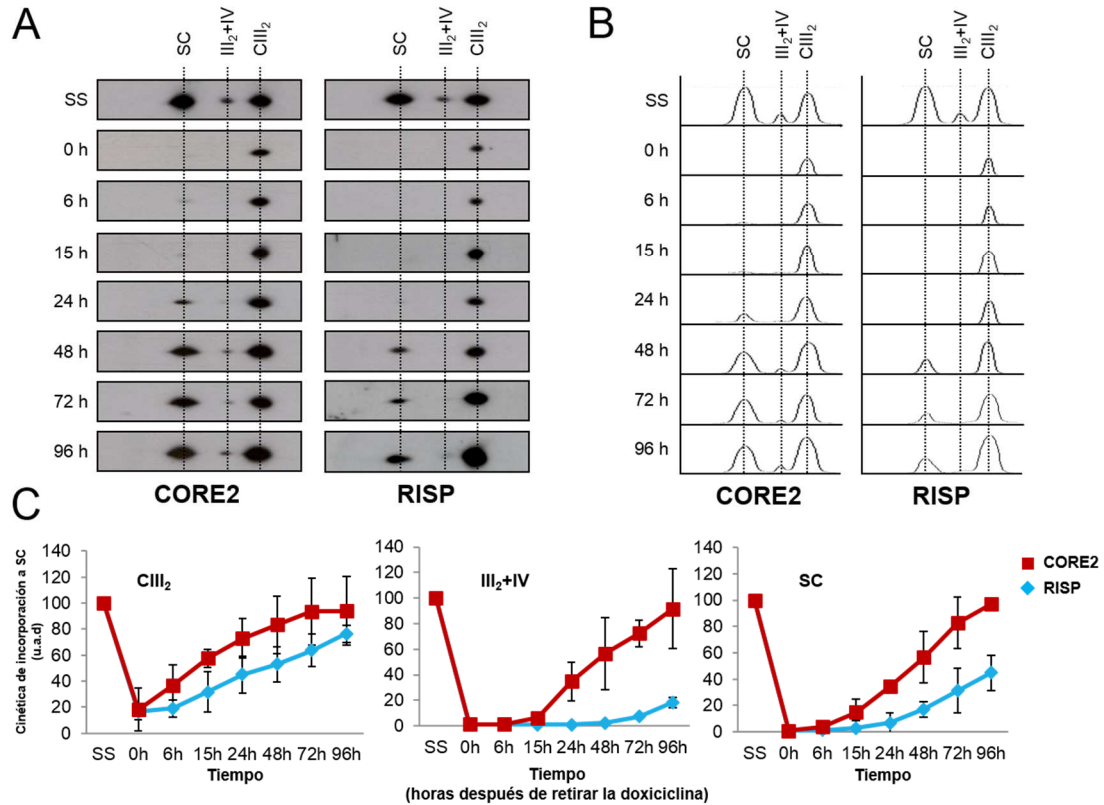


Figura 7. Cinéticas de incorporación de las subunidades del complejo III a los supercomplejos. (A) Las células 143B se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen la subunidades CORE2 y RISP del complejo III. SC; supercomplejos $I+III_2$ y $I+III_2+IV_n$; III_2+IV , supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; $CIII_2$, dímero del complejo III. SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en células 143B sin tratar con doxiciclina. (B) Histograma obtenido a partir de la densitometría del panel A, que representa el proceso de ensamblaje de las subunidades CORE2 y RISP en el complejo III libre y en los supercomplejos. (C) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blots* de al menos dos experimentos independientes para cada línea celular (143B, CC1 y HEK293), se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas en las tres líneas celulares. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d.).

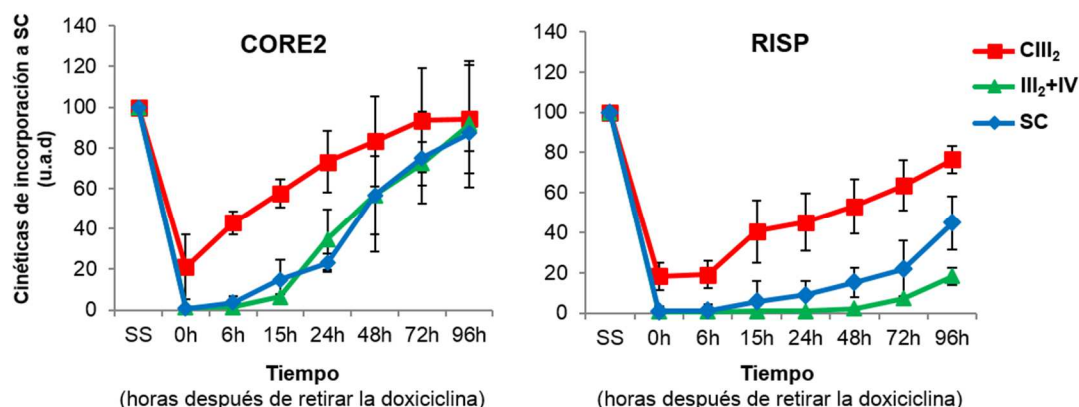


Figura 8. Análisis comparativo de las cinéticas de ensamblaje de las subunidades CORE2 y RISP en el homodímero del complejo III y los supercomplejos. Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot*s de al menos dos experimentos independientes para cada línea celular (143B, CC1 y HEK293), se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas en las tres líneas celulares. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d.). SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIII₂, dímero del complejo III. SS; niveles estacionarios de los complejos de CRM en células 143B sin tratar con doxyciclina.

1.6 Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo IV en los supercomplejos mitocondriales.

A continuación se analizó la incorporación tanto en el complejo IV (CIV) libre como en los supercomplejos III₂+IV y I+III₂+IV_n de cuatro subunidades involucradas en estadios tempranos del ensamblaje del complejo IV humano (las subunidades catalíticas COX1 y COX2, codificadas por el ADNmt y las subunidades estructurales COX4 y COX5A, codificadas por el ADNn), así como de la subunidad COX6C, que se inserta en etapas tardías del ensamblaje del complejo IV (Fornuskova et al 2010; Nijtmans et al 1998) (Figura 9A). La cuantificación de las señales a partir de experimentos de 2D-BN/SDS-PAGE en las tres líneas celulares de estudio, mostró que después de 6-8 días de tratamiento con doxyciclina (0h), existía una reducción del 90% en los niveles de todas las subunidades COX en el complejo IV libre en comparación con las células sin tratar (SS) (Figura 9B).

Los niveles de todas las subunidades se incrementaron en el complejo IV individual (CIV) de forma constante al restaurarse la traducción mitocondrial, alcanzando los niveles estacionarios a las 72-96 horas del tratamiento con doxyciclina. Estos datos confirmarían resultados previos de nuestro laboratorio que sugieren que en

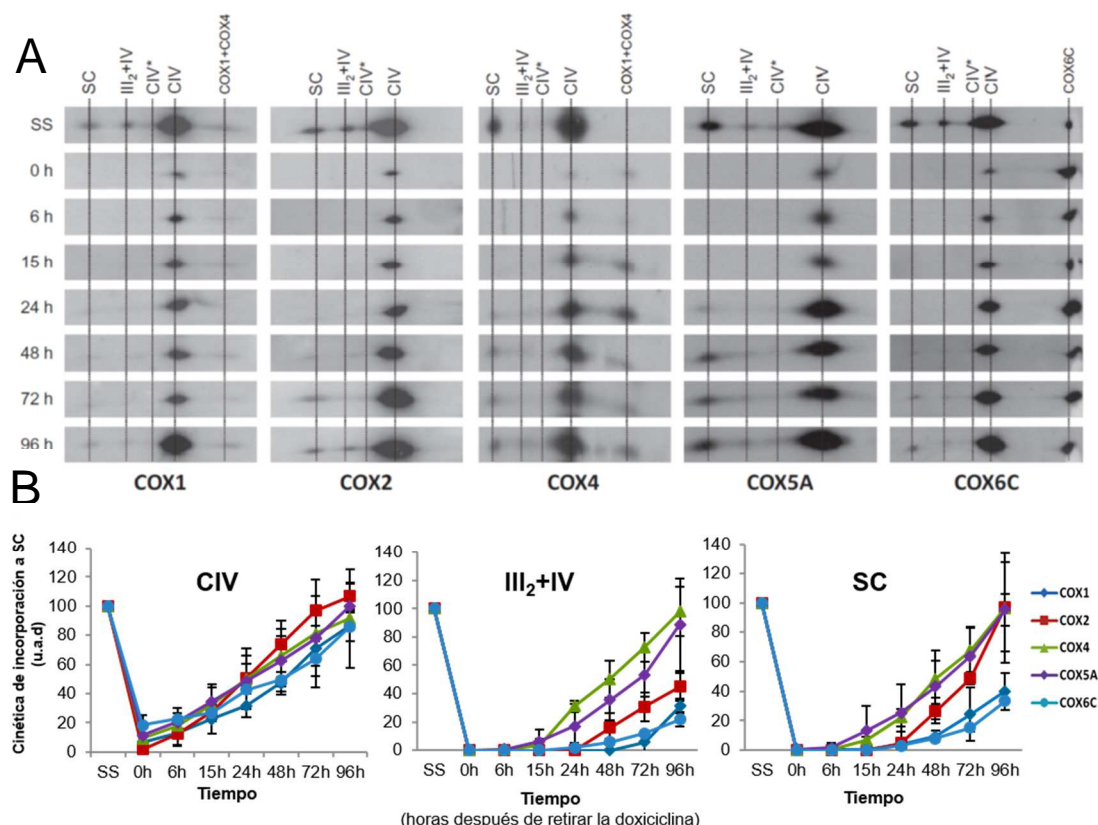


Figura 9. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo IV a los supercomplejos. (A) Las células 143B se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen las subunidades COX1, COX2, COX4, COX5A y COX6C del complejo IV. SC; supercomplejo I+III₂+IV_n; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV, complejo IV; CIV*, posible dímero del complejo IV; COX1+COX4, intermediario de ensamblaje del complejo IV que contiene a las subunidades COX1 y COX4; COX6C, subcomplejo que contiene a la subunidad COX6C del complejo IV. SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en células 143B sin tratar con doxiciclina. (B) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blots* de al menos dos experimentos independientes para cada línea celular (143B, CC1 y HRK293), se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar de todas las medidas realizadas en las tres líneas celulares. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d).

células control humanas, el complejo IV se ensambla de forma retardada con respecto al ensamblaje de los complejos I y III (Pello et al 2008). Respecto a su inserción en los supercomplejos, las subunidades COX4 y COX5A se detectaron de forma paralela en los supercomplejos III₂+IV y I+III₂+IV_n a las 24-48 horas después del tratamiento con doxiciclina (Figuras 9 y 10). Por el contrario, las subunidades COX1, COX2 y COX6C se detectaron inicialmente a bajos niveles en el supercomplejo I+III₂+IV_n a las 48-72 horas de la retirada de la doxiciclina, indicando un retraso en la incorporación de estas

tres subunidades en dichas estructuras. Como se muestra en la Figura 9B, estas subunidades presentaron diferentes cinéticas de incorporación a los supercomplejos I+III₂+IV_n, ya que mientras la subunidad COX2 alcanzó los niveles estacionarios a las 96 horas tras el tratamiento con doxíciclina, los niveles de las subunidades COX1 y COX6C permanecieron bajos en el mismo tiempo (~40-50% del estado estacionario). Curiosamente, las subunidades COX1, COX2 y COX6C comenzaron a detectarse en el supercomplejo III₂+IV con posterioridad, sin llegar a alcanzar los niveles estacionario a las 96 horas del tratamiento con doxíciclina (Figuras 9 y 10). Por tanto, estos resultados sugieren que de forma similar a lo que ocurriría con los complejos I y III, el complejo IV tampoco se encontraría completamente ensamblado ni activo cuando sus subunidades e intermediarios se unen a otros complejos de la CRM para formar los supercomplejos. Estos resultados además apuntan a que la síntesis del supercomplejo I+III₂+IV_n sería un paso previo a la formación del supercomplejo III₂+IV.

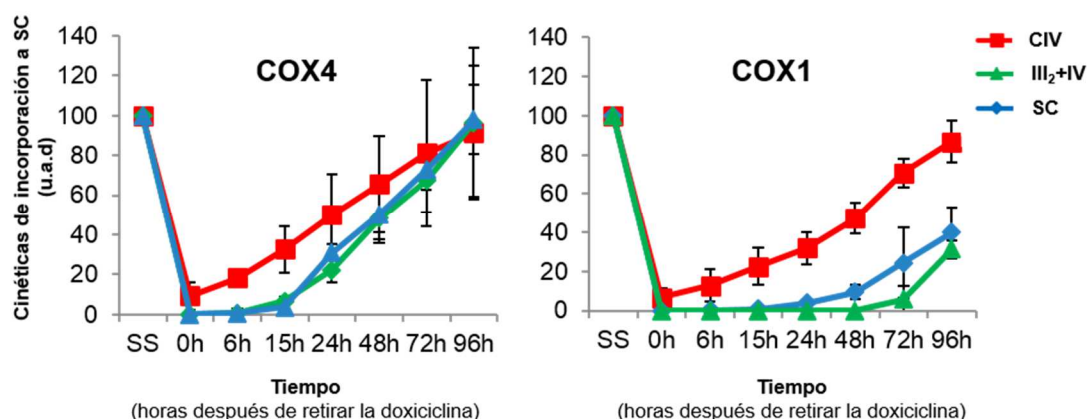


Figura 10. Análisis comparativo de las cinéticas de ensamblaje de las subunidades COX4 y COX1 en el complejo IV libre y los supercomplejos. Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot* de al menos dos experimentos independientes para cada línea celular (143B, CC1 y HRK293), se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas en las tres líneas celulares. SC; supercomplejo I+III₂+IV_n; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV, complejo IV. SS; niveles estacionarios de los complejos de CRM en células 143B sin tratar con doxíciclina. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d).

1.7 Análisis comparativo de las cinéticas de ensamblaje de distintas subunidades OXPHOS en el respirasoma mitocondrial.

Para obtener una visión completa de la ruta de ensamblaje del respirasoma en células control humanas, se realizó un estudio comparativo de las cinéticas de incorporación en los supercomplejos I+III₂+IV_n (SC) de todas las subunidades de CRM

analizadas (Figuras 11 y 12). Nuestros resultados muestran que las subunidades NDUFA9 y NDUFS2 del complejo I se encontrarían inicialmente estabilizadas en el subcomplejo de 830 kDa del complejo I carente del módulo catalítico N (CI*, Figura 6A), el cual constituiría el primer intermediario de ensamblaje de los supercomplejos (SC1). Este intermediario se desplazaría hacia la posición del supercomplejo I+III₂+IV_n a las ~24 horas de retirar la doxyciclina, en paralelo a la incorporación de la subunidad CORE2 del complejo III y de las subunidades COX4 y COX5A del complejo IV, alcanzándose

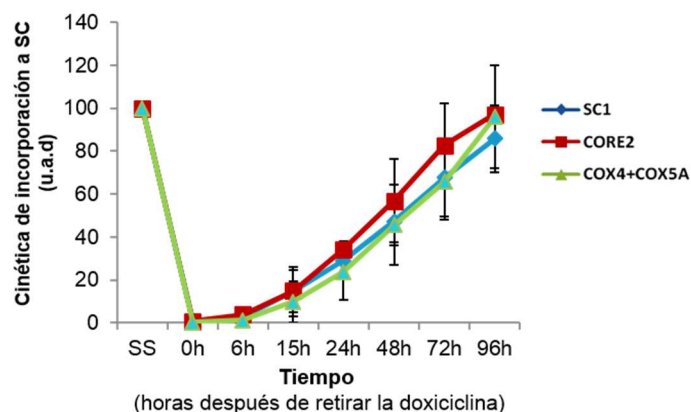


Figura 11. Formación del intermediario de ensamblaje de supercomplejos SC2. SC1 representa la media de las cinéticas de incorporación en los supercomplejos (SC) de las subunidades NDUFA9 y NDUFS2 del complejo I. CORE2 representa la cinética de ensamblaje en los supercomplejos de la subunidad CORE2 del complejo III. COX4+COX5A representa la media de las cinéticas de incorporación en los supercomplejos (SC) de las subunidades COX4 y COX5A del complejo IV. Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *western-blot* de al menos dos experimentos independientes para cada línea celular, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas en las tres líneas celulares (143B, CC1 y HEK293). Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d)

los niveles estacionarios de todas estas subunidades en dicho supercomplejo a las 96 horas (Figura 11). Ello implicaría la formación de un segundo intermediario de ensamblaje de los supercomplejos (SC2), formado por un complejo I parcialmente ensamblado al que se han unido subunidades independientes o intermediarios de los complejos III y IV (Figura 11). Las subunidades NDUFS4 del complejo I y COX2 del complejo IV se incorporarían a los supercomplejos en una tercera etapa de ensamblaje (SC3) (Figura 12A), ya que aunque aparecían en el supercomplejo I+III₂+IV_n aproximadamente a las 48 horas después del tratamiento con doxyciclina, alcanzaron rápidamente los niveles estacionarios de las células sin tratar (SS). Las subunidades catalíticas RISP del complejo III y COX1 del complejo CIV, así como la subunidad estructural COX6C del complejo IV, aparecieron a niveles reducidos en los supercomplejos a las 48-72 horas del tratamiento con doxyciclina. Estos niveles permanecieron bajos a las 96 horas, lo que sugiere una incorporación más lenta de estas

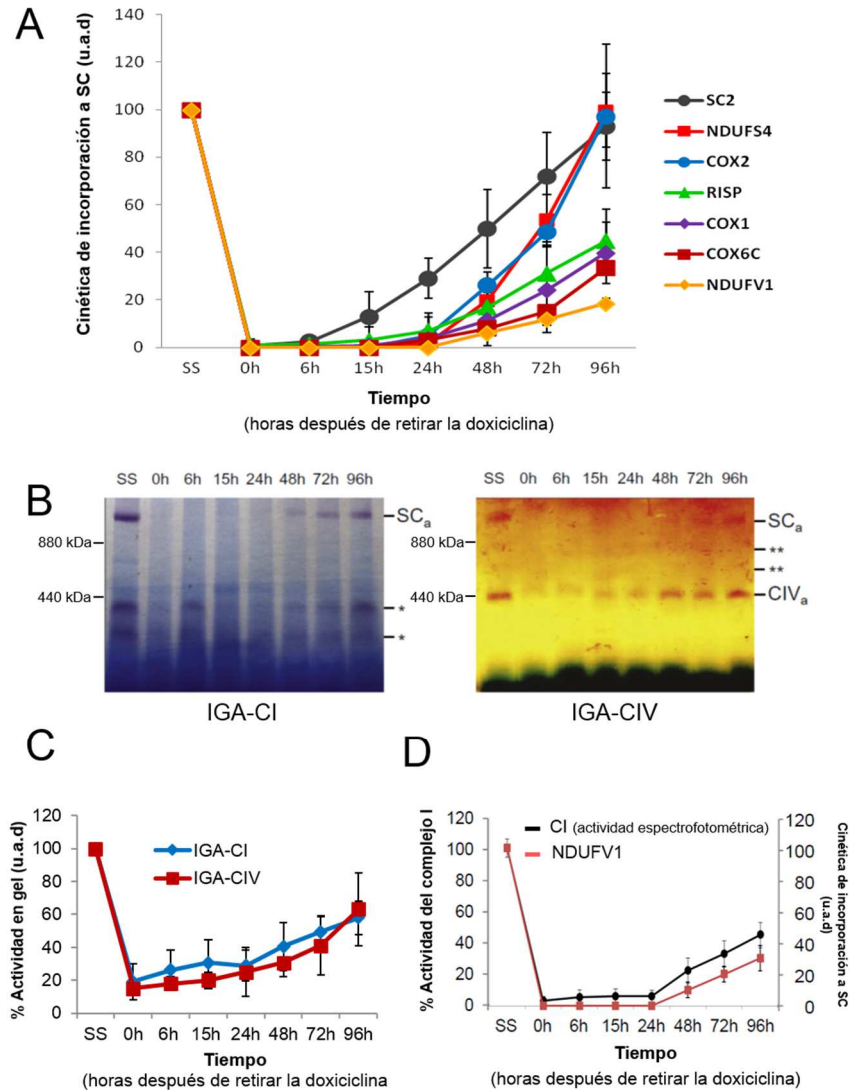


Figura 12. Cinéticas de ensamblaje y activación de los supercomplejos mitocondriales. (A) Cinéticas de incorporación de subunidades de CRM en el supercomplejo I+III₂+IV_n (SC) humano. SC2 representa la media de las cinéticas de incorporación en SC de las subunidades NDUFA9, NDUFS2, CORE2, COX4 y COX5A, indicadas en la Figura 11. (B) Las células 143B se crecieron durante 6 días en presencia de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 60µg de proteína mitocondrial en geles de BN-PAGE con un gradiente del 3-13% de acrilamida/bisacrilamida seguido de ensayos de actividad en gel de los complejos I y IV. SC_a hace referencia a las actividades de los complejos I y IV en supercomplejos. * indica la presencia de bandas inespecíficas con actividad NADH deshidrogenasa; ** indica la actividad del complejo IV (CIV_a) tanto en el posible dímero del complejo IV (CIV*) como en el supercomplejo III₂+IV. A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. (C) Análisis densitométrico de las bandas SC_a de los complejos I y IV realizados en tres experimentos independientes para cada línea celular (143B, CC1 y HEK293). (D) Análisis espectrofotométrico de la actividad enzimática del complejo I en células 143B tratadas con doxiciclina. Las medidas se realizaron por triplicado y se normalizaron con respecto al complejo II (panel C) y respecto a la actividad citrato sintasa (panel D). Los valores medios se representaron como porcentajes relativos respecto a las células sin tratar (SS). Las barras de error representan la desviación estándar (SD). NDUFV1, hace referencia a la cinética de incorporación de la subunidad catalítica NDUFV1 en los SC.

tres subunidades en un cuarto estadio de ensamblaje de los supercomplejos (SC4) (Figura 12A). Debido a la baja abundancia relativa de las subunidades COX1 y COX6C en los supercomplejos a las 96 horas del tratamiento con doxiciclina, no se ha podido establecer cuál de estas dos subunidades se insertaría primero en los supercomplejos. Finalmente, la subunidad catalítica NDUFV1 del complejo I comenzó a detectarse en el supercomplejo I+III₂+IV_n a las 48-72 horas del tratamiento con doxiciclina, pero su cinética de incorporación a los supercomplejos fue marcadamente más lenta que la de las subunidades RISP, COX1 y COX6C. Estos datos sugieren que la incorporación de NDUFV1 en los supercomplejos tendría lugar en un quinto estadio de ensamblaje (SC5) (Figura 12A).

Teniendo en cuenta estos resultados, los supercomplejos deberían adquirir su actividad en paralelo a la incorporación de las subunidades catalíticas RISP, COX1 y NDUFV1, pues éstas participan en los últimos pasos de ensamblaje de los supercomplejos incorporándose a las 48-72 horas tras retirar la doxiciclina del medio. Para confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de BN-PAGE en combinación con ensayos de actividad en gel (IGA) de los complejos I y IV en las tres líneas celulares de estudio (Figuras 12B y 12C). Tras 6 días de tratamiento con doxiciclina (0h), se observó una reducción casi total de las actividades de los complejos I y IV en los supercomplejos I+III₂+IV_n (indicadas como SC_a) en comparación con las células sin tratar (SS). El análisis densitométrico de las bandas positivas para los ensayos de actividad en gel mostró un aumento gradual de la actividad de ambos complejos en los supercomplejos a las ~48 horas después del tratamiento con doxiciclina, pero sin llegar a alcanzar las actividades del estado estacionario después de 96 horas (Figura 12C). Dichos resultados se confirmaron mediante la medición espectrofotométrica de la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I sensible a rotenona, cuyos niveles aumentaron en paralelo a la detección de la subunidad NDUFV1 en los supercomplejos (Figura 12D).

1.8 Incorporación del módulo NADH-deshidrogenasa en los supercomplejos de células control humanas.

Con el fin de ampliar el estudio de la incorporación de subunidades del módulo NADH deshidrogenasa del complejo I en los supercomplejos, se analizó la incorporación a los supercomplejos de la subunidad NDUFV1, así como de la subunidad NDUFV1 utilizando para ellos un segundo anticuerpo policlonal contra esta subunidad

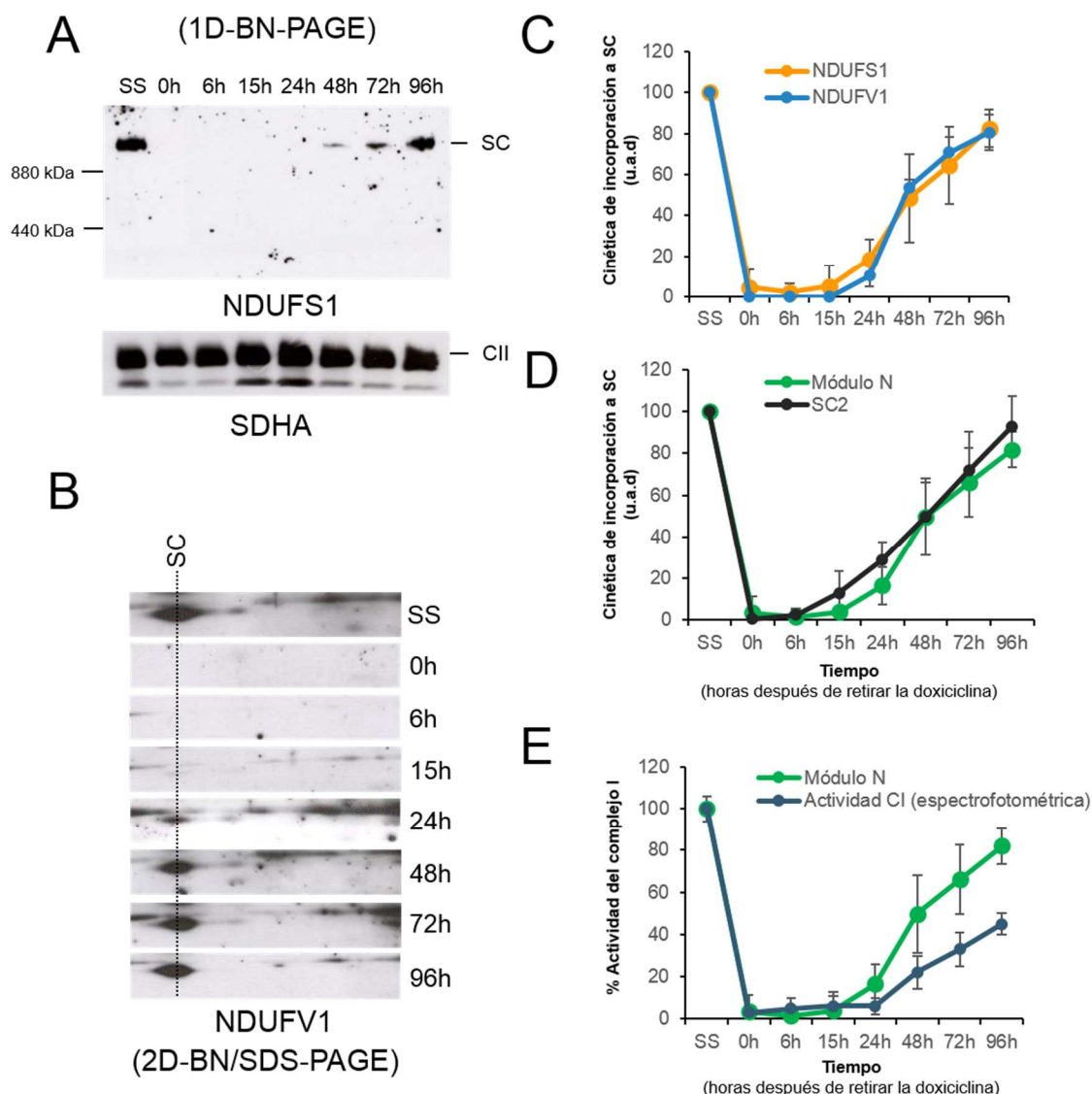


Figura 13. Cinéticas de incorporación de las subunidades NDUFV1 y NDUFS1 del módulo NADH deshidrogenasa a los supercomplejos. Las células 143B se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 60 µg de proteínas mitocondriales en geles de 1D-BN-PAGE (A) y en geles de 2D-BN/SDS-PAGE (B) en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFS1 y NDUFV1 (policlonal) del complejo I y SDHA del complejo II. A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. (C) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot*s de al menos dos experimentos independientes para las líneas celulares 143B y CC1, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). (D) Módulo N, representa la media de las cinéticas de incorporación en los supercomplejos (SC) de las subunidades NDUFV1 y NDUFS1 del complejo I. Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas en las líneas celulares 143B y CC1. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). (E) Análisis espectrofotométrico de la actividad enzimática del complejo I en células 143B tratadas con doxiciclina en comparación con la cinética de incorporación en supercomplejos del módulo NADH deshidrogenasa. SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en células control sin tratar con doxiciclina. SC; supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; CII, complejo II.

(Figura 13). Una vez reiniciada la traducción de las proteínas mitocondriales tras la retirada de la doxíciclina del medio de cultivo, la subunidad NDUF51 comenzó a detectarse a bajos niveles en los supercomplejos a partir de las 15-24 horas después del tratamiento, casi alcanzando sus niveles estacionarios (SS) a las 96 horas (Figura 13A). El nuevo análisis de la subunidad NDUFV1 reveló un patrón similar de incorporación a los supercomplejos al de la subunidad NDUF51 (Figuras 13B y 13C). En resultados previos, la incorporación de la subunidad NDUFV1 a los supercomplejos analizada con el anticuerpo monoclonal se había detectado a las 48-72 horas del tratamiento con doxíciclina. Las diferencias observadas entre los diferentes anticuerpos utilizados de la subunidad NDUFV1 en células control posiblemente sean debidas a diferencias en su especificidad.

El análisis de los epitopos que reconocen los anticuerpos de la subunidad NDUFV1 reveló que el anticuerpo monoclonal reconoce una secuencia localizada en el extremo carboxilo terminal de NDUFV1, mientras que el anticuerpo policlonal reconoce una región localizada en el extremo amino terminal. Ello sugiere que posiblemente la diferencia de especificidad venga determinada por el reconocimiento de diferentes epitopos por cada uno de los anticuerpos.

Estos resultados sugieren que la inserción del módulo NADH deshidrogenasa en los supercomplejos no tendría lugar como último estadio de ensamblaje (tal como se indica en la Figura 12A), sino que ocurriría en paralelo a la formación del intermediario de ensamblaje de los supercomplejos SC2 (Figura 13D). Dado que según el nuevo análisis, la actividad enzimática NADH deshidrogenasa del complejo I sensible a rotenona se encuentra retrasada 24 horas con respecto a la inserción de las subunidades del módulo N (Figura 13E), lo que sugiere la existencia de un desfase entre la formación del complejo I y la activación del mismo.

2 ENSAMBLAJE DE LOS SUPERCOMPLEJOS MITOCONDRIALES EN CÍBRIDOS PORTADORES DE MUTACIONES HOMOPLÁSMICAS EN SUBUNIDADES DE LA CADENA RESPIRATORIA.

2.1 Características de los cíbridos mutantes.

La utilización de cíbridos portadores de mutaciones homoplásmicas en el ADNmt que generan alteraciones en la biogénesis de los complejos OXPHOS individuales, son una valiosa herramienta para poder definir de forma precisa la ruta de biosíntesis del respirasoma mitocondrial. Las mutaciones en subunidades de los complejos de CRM que forman los supercomplejos pueden originar la acumulación de nuevos intermediarios de ensamblaje que no se detectan en células control, permitiendo detallar de una forma más precisa el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales. Para el presente estudio se dispuso de tres líneas celulares con mutaciones homoplásmicas en los genes *MT-ND2* del complejo I, *MT-CYB* del complejo III y en *MT-CO2* del complejo IV. A continuación se muestra una tabla con las principales características de los cíbridos transmitocondriales mutantes (Tabla 2).

Tabla 2. Características genéticas, bioquímicas y clínicas de los cíbridos transmitocondriales mutantes de estudio.

| Línea celular | Mutación | Subunidad y complejo | Defecto enzimático | Fallos de ensamblaje | Características patológicas | Referencia |
|---------------|-------------|--|--|--|--|------------------------|
| <i>MT-ND2</i> | m.4681 T>C | Subunidad ND2 del complejo I. | Déficit aislado del complejo I en músculo esquelético, fibroblastos y cíbridos. | Bajos niveles de complejo I y acúmulo de subcomplejos de 400 y 600 kDa | Síndrome de Leigh | Ugalde et al 2007 |
| <i>MT-CYB</i> | m.15533 A>G | Subunidad citocromo <i>b</i> del complejo III. | Déficit del complejo III en músculo y déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos. CRM normal en cíbridos. | Retraso en las cinéticas de ensamblaje de los complejos I, III y IV. | Acidosis láctica, convulsiones, retraso mental leve y alteraciones de la conducta. | Gil-Borlado et al 2010 |
| <i>MT-CO2</i> | m.7896 G>A | Subunidad COX2 del complejo IV. | Déficit aislado del complejo IV en músculo esquelético. | Ausencia de ensamblaje del complejo IV. | Hipotonía, retraso psicomotor, acidosis láctica., cardiopatía hipertrófica leve y retinopatía pigmentaria. | Campos et al 2001 |

2.2 Análisis en cíbridos mutantes en el gen *MT-ND2*.

En primer lugar, se estudió el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales en una línea de cíbridos portadores de la mutación homoplásmica m.4681T>C, que afecta a la subunidad ND2 del complejo I generando el cambio de aminoácido p.L71P. Dicha alteración está asociada a Síndrome de Leigh, en un paciente pediátrico que mostró un déficit aislado de complejo I acompañado de alteraciones en el ensamblaje de dicho complejo (Tabla 2) (Ugalde et al, 2007).

2.2.1 Niveles estacionarios de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en *MT-ND2*.

Se analizaron los niveles estacionarios de los supercomplejos mediante BN-PAGE en combinación con *Western-blot* y un ensayo de actividad enzimática en gel del complejo I. Se observó una reducción drástica de dicha actividad en las bandas que corresponden a los supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n en comparación con las células 143B, que se utilizaron como control (Figura 14A). Así mismo, el análisis de *Western-blot* en geles de 1D-BN-PAGE utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFS1, CORE2 y COX1 de los complejos I, III y IV, respectivamente, mostraron una reducción del 90% de estas subunidades en los supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n (Figura 14A). Un ensayo posterior mediante 2D-BN/SDS-PAGE confirmó la disminución de los niveles de estos supercomplejos en el cíbrido mutante al analizar el patrón de distribución de las subunidades NDUFA9 y NDUFS2 del complejo I, CORE2 y RISP del complejo III y las subunidades COX4, COX5A y COX6C del complejo IV (Figura 14B). A diferencia de los controles, no se detectaron las subunidades COX4 y COX6C del complejo IV en los supercomplejos I+III₂+IV_n. El análisis del supercomplejo III₂+IV con las subunidades CORE2, RISP, COX4, COX5A, y COX6C mostró niveles similares de esta estructura en los cíbridos mutantes con respecto al control.

Además, al analizar el patrón de distribución de las subunidades NDUFA9 y NDUFS2, se observó un acúmulo de intermediarios de ensamblaje del complejo I. Al analizar la distribución relativa de las subunidades CORE2 y RISP se observó un aumento relativo en los niveles del complejo III libre, así como un incremento de las formas monoméricas o subcomplejos del complejo III que contienen a dichas subunidades. Las subunidades COX4, COX5A y COX6C se detectaron a niveles

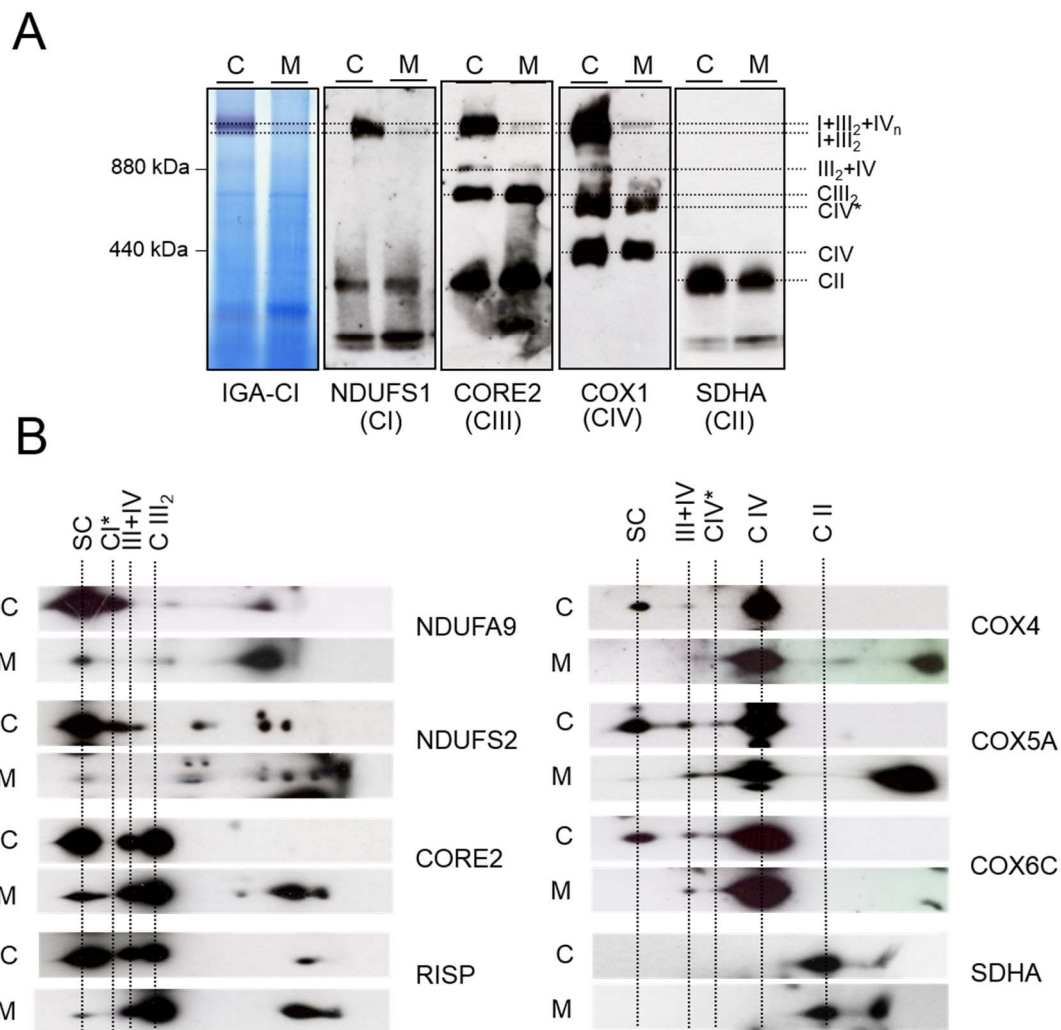


Figura 14. Niveles estacionarios de los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en el gen *MT-ND2*. Se analizaron 60µg de mitocondria purificada a partir de cíbridos portadores de la mutación homoplásmica m.4681T>C en *MT-ND2* (M) y células 143B (C). **(A)** Análisis de los niveles estacionarios de los complejos y supercomplejos de CRM mediante 1D-BN-PAGE y ensayo de actividad en gel del complejo I (IGA-CI). A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. **(B)** Análisis de los niveles estacionarios mediante 2D-BN/SDS-PAGE en células 143B (C) y mutantes (M). SC, supercomplejos que contienen a los complejos I, III y IV; C*, intermediario de 830kDa del complejo I; CIII₂, homodímero del complejo III; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV, complejo IV; CIV*, posible dímero del complejo IV; CII, complejo II.

normales en el complejo IV libre del cíbrido mutante en *MT-ND2*. También se detectó un aumento de intermediarios del complejo IV que contienen a las subunidades COX4 y COX5A, sin observarse la acumulación de subcomplejos que contienen a la subunidad COX6C.

Los niveles estacionarios del complejo II fueron similares entre los cíbridos mutantes en *MT-ND2* y en las células control y de nuevo, dicho complejo no colocalizó con los supercomplejos (Figuras 14A y 14B). El conjunto de estos resultados sugiere que los defectos en el ensamblaje del complejo I causados por la mutación p.L71P en la subunidad ND2, generan alteraciones graves en la formación o estabilidad de los supercomplejos.

2.2.2 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo I en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en el gen *MT-ND2*.

Para estudiar cómo las alteraciones provocadas por la mutación p.L71P en ND2 afectan a la formación o estabilidad del complejo I y de los supercomplejos, las células se sometieron a un tratamiento con doxiciclina y posteriormente se analizaron mediante electroforesis azul nativa en combinación con ensayos de actividad enzimática en gel de complejo I y *Western-blot*, utilizando anticuerpos que reconocen subunidades de distintos estadios del ensamblaje del complejo I (Figura 15). Concretamente, se analizaron las cinéticas de incorporación a supercomplejos de las subunidades NDUFA9, NDUFV1 y NDUF51. Tras 6 días de tratamiento con doxiciclina (Figura 15A, 0h), se observó en geles 1D-BN-PAGE una ausencia total de la actividad del complejo I en los supercomplejos en comparación con las células sin tratar (SS). Dicha actividad comenzó a restaurarse a las 72h de la retirada de la doxiciclina del medio de cultivo. Al comparar estos resultados con los ensayos de actividad en gel del complejo I en las células control 143B (Figura 15A), las células mutantes en *MT-ND2* presentaron un retardo de al menos 24 horas en la aparición de dicha actividad en los supercomplejos.

El análisis en geles 2D-BN/SDS-PAGE mostró a tiempo 0h un acúmulo de la subunidad NDUFA9 en un subcomplejo que podría corresponder al intermediario de ensamblaje de ~400kDa del complejo I (Sub CI, Figura 15B) (Antonicka et al, 2003; Lazarou et al, 2007). Una vez restaurada la traducción mitocondrial, dicho subcomplejo comenzó a desplazarse al intermediario de ~830 kDa (CI*) a las 15-24 horas de retirar el antibiótico y posteriormente se detectó los supercomplejos a las 24-48 horas, sin llegar a alcanzar los niveles estacionarios a las 96h post-tratamiento (Figura 15C). Dicha cinética de incorporación se encontró retardada en los cíbridos mutantes en *MT-ND2* con respecto a los controles, en los cuales la subunidad NDUFA9 se comenzó a detectar en los supercomplejos a las 15h-24 horas después de retirar la doxiciclina (Figura 15C).

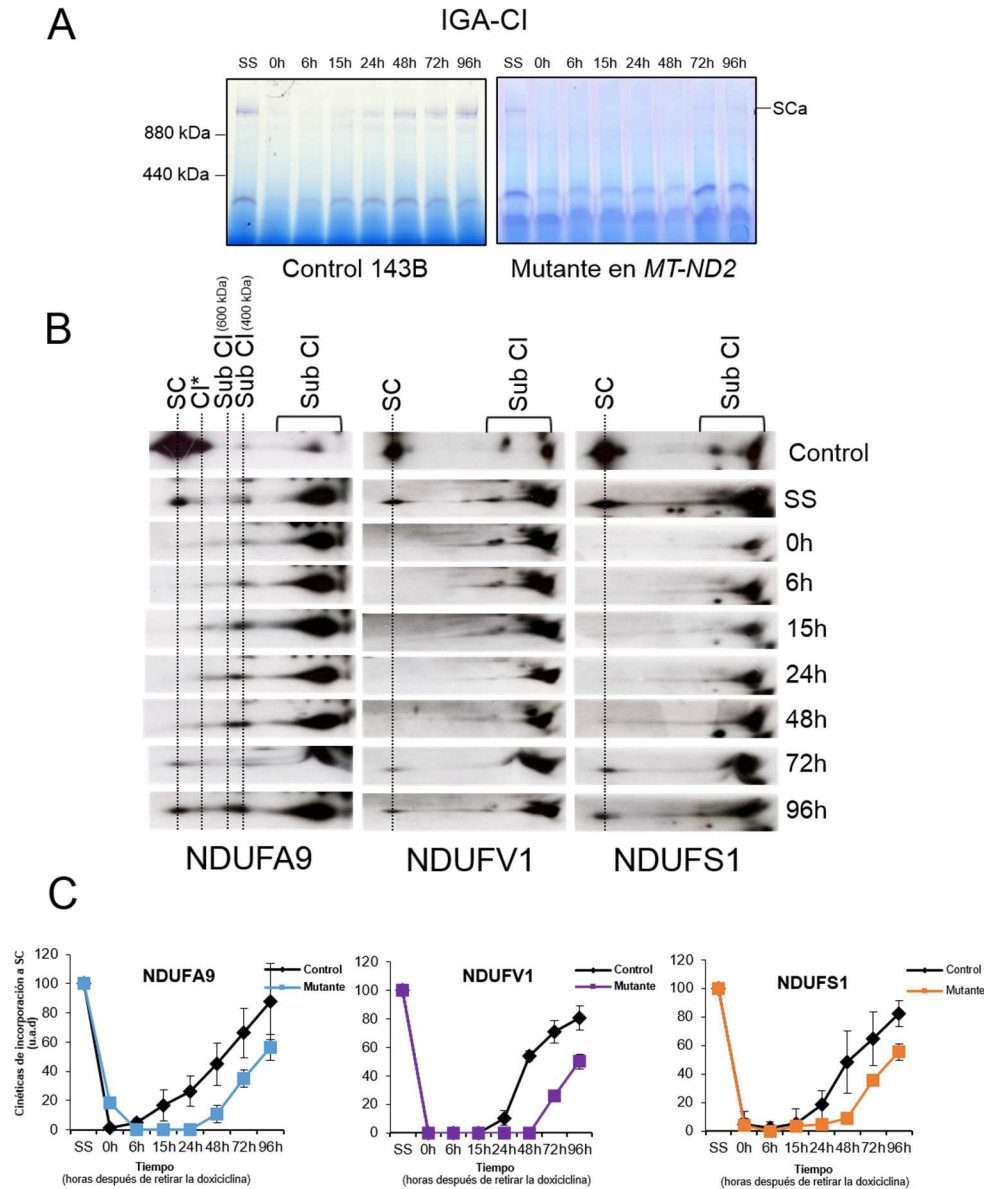


Figura 15. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo I a los supercomplejos de cíbridos mutantes de *MT-ND2*. (A) Se crecieron células 143B y cíbridos mutantes en *MT-ND2* durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial mediante la sustitución del medio por un medio de cultivo normal, se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 60µg de proteína mitocondrial en geles de BN-PAGE con un gradiente del 3-13% de acrilamida/bisacrilamida seguido de un ensayo de actividad en gel de complejo I (IGA-CI). SCa, actividad enzimática del complejo I en los supercomplejos. A la derecha se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. (B) Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9, NDUFS1 y NDUFV1 del complejo I. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; CI*, intermediario de 830 kDa del complejo I; Sub CI, subcomplejos del complejo I; SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en cíbridos mutantes sin tratar con doxiciclina (C) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blots* de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades NDUFA9, NDUFS1 y NDUFV1 en las células control corresponden a las descritas en las Figuras 6B y 13C.

Por otro lado, las subunidades NDUFS1 y NDUFV1 se acumularon a tiempo 0h en subcomplejos de bajo peso molecular que podrían corresponder a intermediarios de ensamblaje del complejo I que avanzan hacia estructuras de mayor tamaño (Sub CI, Figura 15B) y finalmente se detectaron en los supercomplejos a las 48-72 horas post-tratamiento (Vogel et al., 2007b), sin llegar a alcanzar los niveles estacionarios a las 96 horas (Figura 15C). Estos hallazgos indicando un retraso relativo en la incorporación de la subunidades que conforman el módulo N respecto a la subunidad NDUF9. Ello apoyaría que para que ocurra el ensamblaje del complejo I en los supercomplejos, se requiere de la formación previa del intermediario de ~830 kDa, en el que se encontraría la subunidad NDUF9, al cual posteriormente se incorporaría el módulo NADH deshidrogenasa, del que forman parte las subunidades NDUFV1 y NDUFS1. La detección en los supercomplejos de las todas las subunidades del complejo I analizadas a las 72 horas del tratamiento con doxiciclina, sugiere que los bajos niveles del intermediario de ~830 kDa que se sintetizan son rápidamente utilizados para su incorporación en los supercomplejos.

2.2.3 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo III en los supercomplejos mitocondriales de híbridos mutantes en *MT-ND2*.

A continuación, se analizó la integración de las subunidades CORE2 y RISP tanto en el dímero del complejo III como en los supercomplejos I+III₂+IV_n y III₂+IV. Después de 6 días de tratamiento con doxiciclina (Figura 16A, 0h), se observó una reducción del ~70-80% de ambas subunidades en el dímero del complejo III respecto a las células sin tratar (SS), así como la acumulación de las subunidades bien en forma monomérica o bien integradas en intermediarios del complejo III de bajo peso molecular (Figura 16A, Sub CIII). Una vez restaurada la traducción de proteínas codificadas por el ADNmt los niveles del dímero del complejo III se incrementaron gradualmente, obteniéndose cinéticas de incorporación de ambas subunidades comparables a las de los controles (Figura 16B). Las subunidades CORE2 y RISP comenzaron a detectarse en los supercomplejos I+III₂+IV_n a las 48 y 72 horas del tratamiento con doxiciclina, respectivamente, mientras que en los controles la subunidad CORE2 se detectó hacia las 24 horas y la subunidad RISP a las 48 horas post-tratamiento. Ninguna de las dos subunidades alcanzó sus niveles máximos en el supercomplejo I+III₂+IV_n a las 96h del tratamiento con doxiciclina, obteniéndose unos niveles del ~50% para la subunidad CORE2 y del ~15% para la subunidad RISP (Figura 16B). Estos resultados indican un

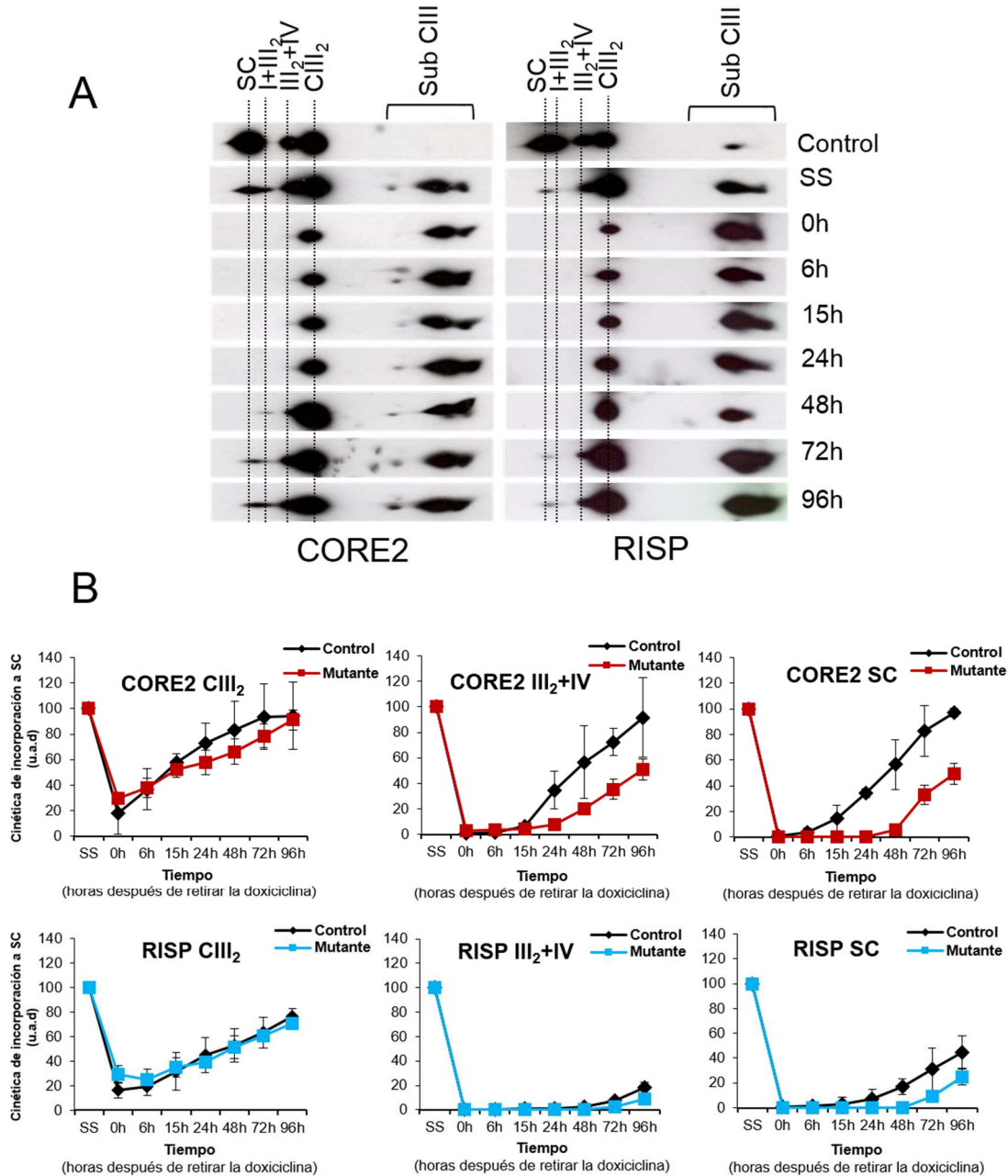


Figura 16. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo III a los supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-ND2*. (A) Los cíbridos mutantes se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen la subunidades CORE2 y RISP del complejo III. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIII₂, dímero del complejo III; Sub CIII, subcomplejos del complejo III; SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en los cíbridos mutantes sin tratar con doxiciclina. (B) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot*s de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades CORE2 y RISP en células control corresponden a las descritas en la Figura 7C.

retraso en el ensamblaje del complejo III en los supercomplejos en células mutantes con respecto a las control. Además, en cíbridos mutantes en *MT-ND2* la subunidad RISP se incorporaría en el supercomplejo I+III₂+IV_n con posterioridad a la subunidad CORE2, al igual que ocurría en células control. Por otro lado, las subunidades CORE2 y RISP comenzaron a detectarse en el supercomplejo III₂+IV a las 48 y 72-96 horas respectivamente de la retirada del antibiótico, sin alcanzar los niveles estacionarios a las 96 horas, lo que indicaría de nuevo un retraso en la formación del supercomplejo III₂+IV en células mutantes con respecto a los controles. Por otro lado, los niveles relativos de la subunidad CORE2 fueron mayores en el supercomplejo III₂+IV que en el supercomplejo I+III₂+IV a las 48 horas post-tratamiento, lo que sugiere que la formación del supercomplejo III₂+IV es previa e independiente de la biogénesis del supercomplejo I+III₂+IV.

Estos resultados sugieren que la mutación m.4681T>C en la subunidad ND2, que induce un retraso en la síntesis del intermediario de ~830 kDa del complejo I, podría provocar a su vez un retardo en la incorporación de subunidades del complejo III a los supercomplejos, pero sin afectar al proceso de biosíntesis del dímero complejo III.

2.2.4 Cinéticas de ensamblaje de las subunidades del complejo IV en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en *MT-ND2*.

Por último, se analizó la incorporación de las subunidades COX1, COX4, COX5A y COX6C tanto en el complejo IV libre como en los supercomplejos III₂+IV y I+III₂+IV_n. La cuantificación de las señales a partir de experimentos de BN-PAGE mostró que después de 6 días de tratamiento con doxiciclina (0h), existía una reducción del 80-90% en los niveles de todas las subunidades en el complejo IV en comparación con las células sin tratar (SS) (Figura 17). Al restaurarse la traducción mitocondrial, los niveles de todas las subunidades COX aumentaron gradualmente en el complejo IV de forma comparable entre las células control y mutantes (Figura 18A).

Respecto a su inserción en los supercomplejos, se detectó claramente la presencia de las subunidades COX1 y COX5A en el supercomplejo III₂+IV a las 48-72 horas del tratamiento con doxiciclina, sin intuirse la presencia de las subunidades COX4 y COX6C en dicha estructura hasta las 96 horas después del tratamiento (Figuras 17A, 17B y 18). Con respecto al supercomplejo I+III₂+IV_n, se detectaron las subunidades COX1 y COX5A a las 72-96 horas post-tratamiento con doxiciclina (Figuras 17B, 17C

y 19), sin llegarse a detectar la presencia de las subunidades COX4 y COX6C en dicha estructura (Figuras 17A y 19).

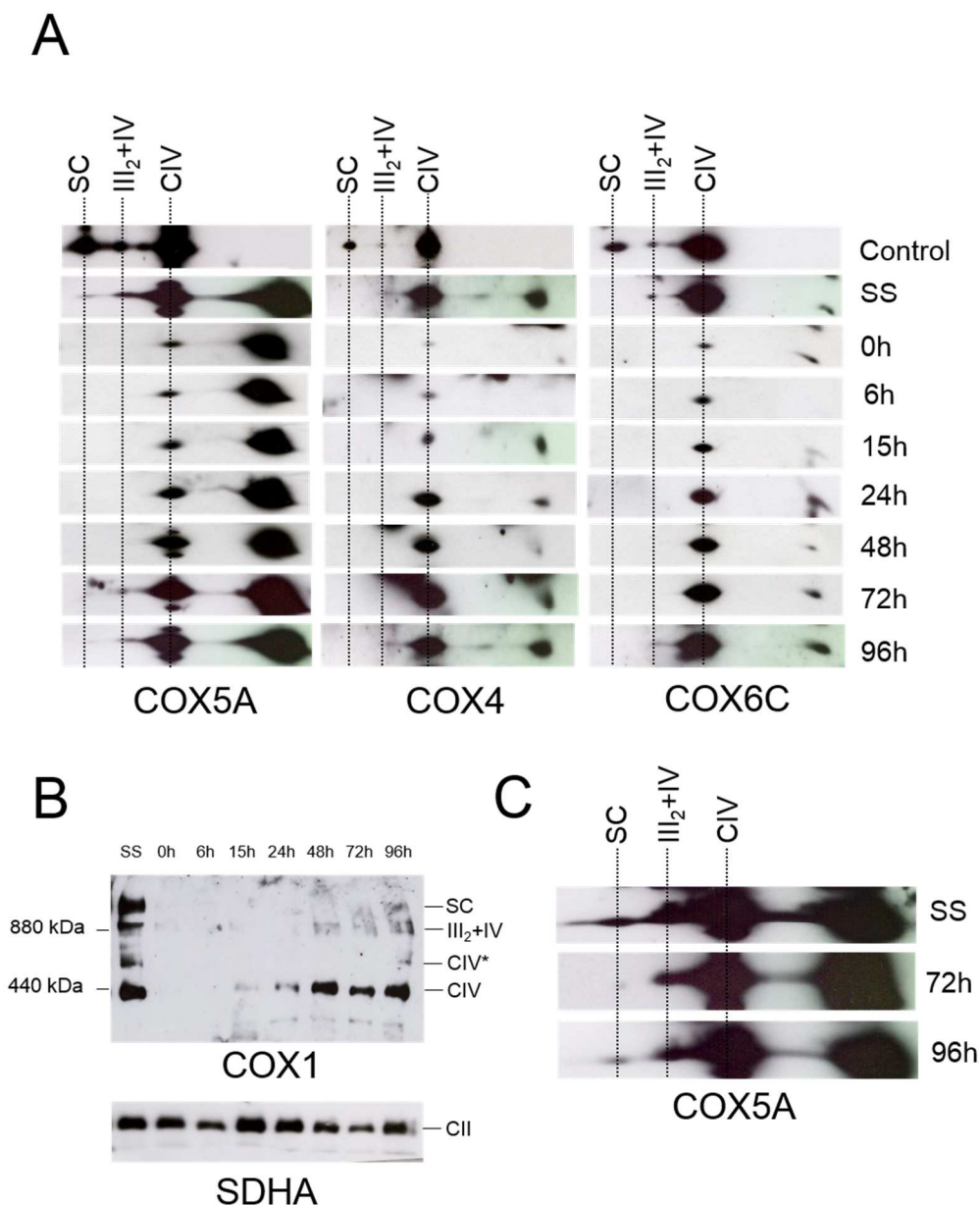
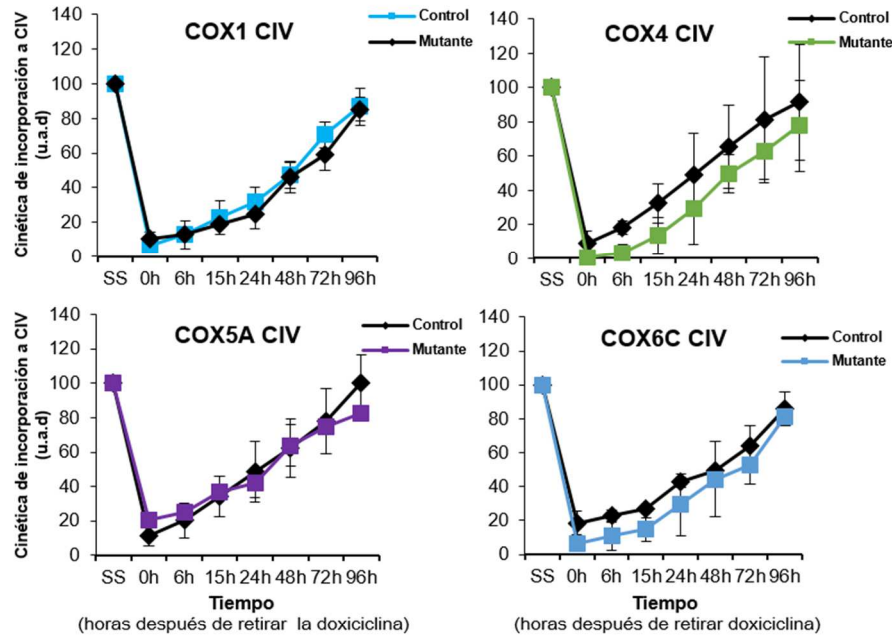


Figura 17. Análisis mediante BN-PAGE de la incorporación de subunidades del complejo IV a los supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-ND2*. (A) Los cíbridos mutantes se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial, se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen la subunidades COX4, COX5A y COX6C del complejo IV. (B) Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles 1D-BN-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen la subunidades COX1 del complejo IV y SDHA del complejo II (utilizada como control de carga). (C) Distribución en complejos y supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-ND2* de la subunidad COX5A a altas exposiciones. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV, complejo IV. CIV*; posible dímero del complejo IV. SS, niveles estacionarios de los complejos de CRM en células mutantes sin tratar con doxiciclina.

A



B

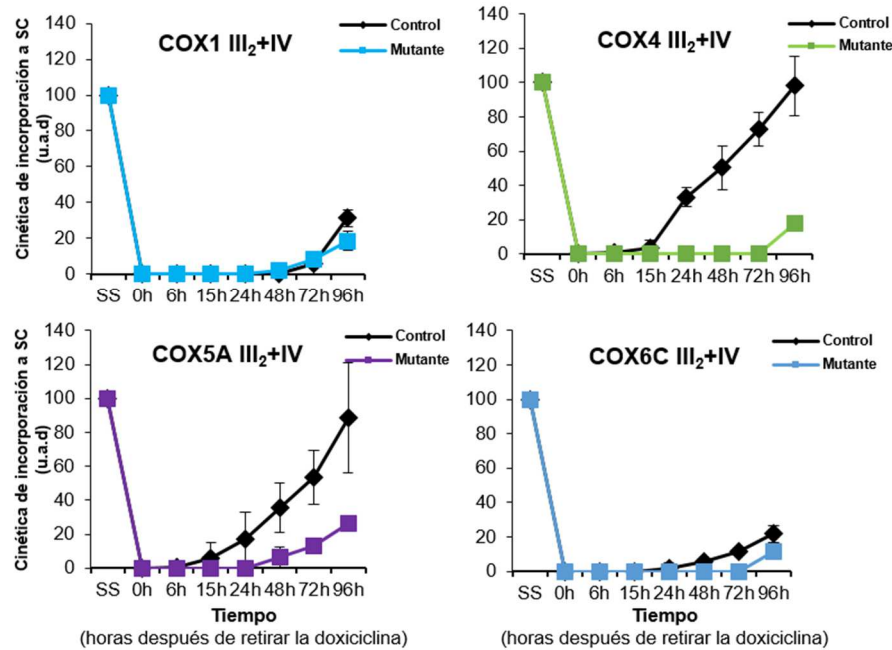


Figura 18. Cinéticas de incorporación de subunidades COX al supercomplejo III₂+IV y al complejo IV libre de cíbridos mutantes en *MT-ND2*. Se analizó la incorporación de las subunidades COX1, COX4, COX5A y COX6C al complejo IV libre (A) y al supercomplejo III₂+IV (B). Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot*s de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades COX1, COX5A, COX4 y COX6C en células control corresponden a las descritas en la Figura 9B.

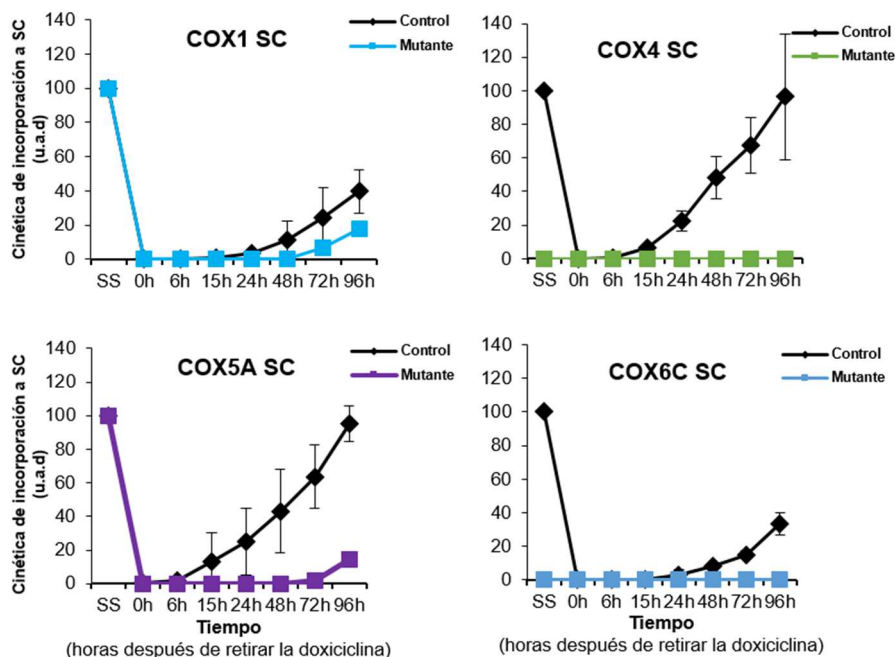


Figura 19. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo IV a los supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-ND2*. Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot* de al menos dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades COX1, COX5A, COX4 y COX6C en células control corresponden a las descritas en la Figura 9B.

Al igual que ocurría con las subunidades de complejo III, las subunidades COX se insertarían en el supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ en un paso previo a la formación del supercomplejo $\text{I+III}_2\text{+IV}$, sugiriendo que la formación del supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ podría ocurrir de forma independiente a la del $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$. Estos resultados sugieren que la mutación m.4681T>C en la subunidad ND2 del complejo I provocaría un retraso en la incorporación de subunidades del complejo IV en los supercomplejos, pero sin provocar alteraciones en la ruta de ensamblaje del complejo IV libre.

2.2.5 Formación del respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en *MT-ND2*.

Para obtener una visión global de la formación del supercomplejo $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$ o respirasoma en células mutantes en *MT-ND2*, se realizó un análisis paralelo de las cinéticas de incorporación de todas las subunidades de CRM analizadas (Figura 20). Los resultados muestran que la formación del respirasoma en estos mutantes sufre un retraso considerable, posiblemente como consecuencia de que la mutación en *MT-ND2* afectaría a etapas tempranas del ensamblaje del complejo I, retrasando la formación del

intermediario de 460 kDa y por tanto la formación del intermediario de 830 kDa. La subunidad NDUFA9 del complejo I se encontraría colocalizando en dicho subcomplejo de 830 kDa carente del módulo catalítico N y por tanto inactivo. Este intermediario se desplazaría hacia la posición del supercomplejo I+III₂ a las ~48 horas de retirar el tratamiento con doxiciclina, en paralelo a la incorporación de la subunidad CORE2 del complejo III y las subunidades NDUFV1 y NDUFV1 del complejo I, las cuales comenzarían a detectarse en los supercomplejos con anterioridad a la detección de la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I (Figura 15A). Estos resultados implicarían la formación de un nuevo intermediario de ensamblaje de supercomplejos, formado por un complejo I totalmente ensamblado e inactivo que estaría unido al complejo III parcialmente ensamblado e inactivo, ya que carecería al menos de la subunidad catalítica RISP. Debido a que las cinéticas de incorporación a supercomplejos de las subunidades NDUFV1 y NDUFV1 fueron similares a las cinéticas de NDUFA9 y CORE2, no se ha podido determinar si la incorporación del módulo N del complejo I ocurriría en un paso posterior o en paralelo a la incorporación de CORE2. Posteriormente, se incorporaría la subunidad catalítica RISP del complejo III (Figura 16), ya que aparece en el supercomplejo I+III₂+IV_n a las 72 horas del tratamiento con doxiciclina y a niveles más bajos que las anteriores subunidades. Por último comenzaría la incorporación al respirasoma de las subunidades del complejo IV, comenzando con la inserción de las subunidades COX1 y COX5A, que se detectaron a las 72-96 horas del tratamiento con doxiciclina (Figura 19). El hecho de que las subunidades COX4 y

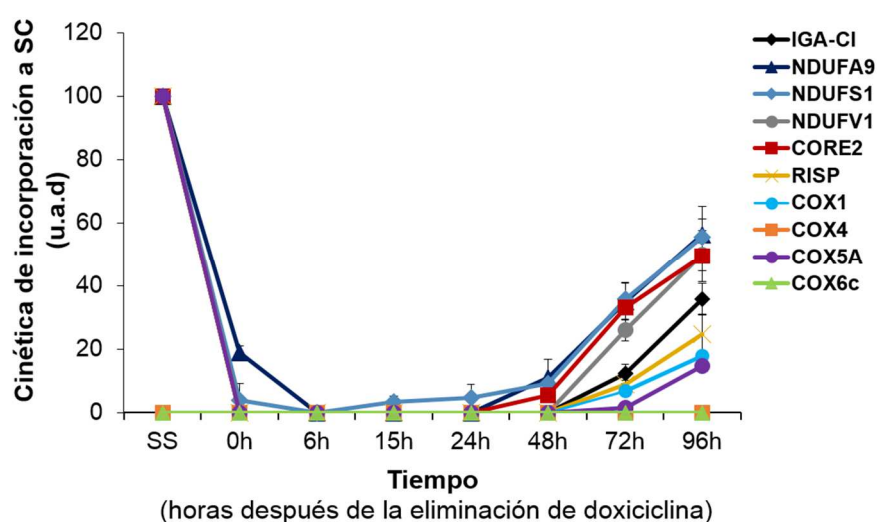


Figura 20. Formación el respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en *MT-ND2*. Cinéticas de incorporación a los supercomplejos I+III₂+IV_n obtenidas de cada una de las subunidades de estudio. Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d)

COX6C no se detecten en los supercomplejos I+III₂+IV_n a las 96 horas post-tratamiento indicaría que dichas subunidades se incorporarían a los supercomplejos en pasos posteriores a COX1 y COX5A. A diferencia de lo que se observó en las células control, en los cíbridos mutantes en *MT-ND2* ninguna de las subunidades de CRM analizadas alcanzaron sus niveles máximos 96 horas después del tratamiento con doxiciclina, lo que indicaría que los fallos en el ensamblaje del complejo I retrasan la correcta formación del supercomplejo I+III₂+IV_n.

2.3 Análisis en cíbridos mutantes en el gen *MT-CYB*.

A continuación, se analizó la formación de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en el gen *MT-CYB*, que codifica la subunidad catalítica citocromo b del complejo III. La mutación de estudio, m.15533A>G, se detectó en un paciente con acidosis láctica, convulsiones, retraso mental leve y alteraciones de la conducta y está asociado a un déficit enzimático aislado del complejo III en músculo y un déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos (Gil-Borlado et al 2010) (Tabla 2). Dicha mutación genera un cambio de asparragina por aspartato en la posición 263 (p.N263D). El análisis mediante BN-PAGE de los complejos individuales de CRM en mitocondrias purificadas con lauril maltósido no reveló alteraciones significativas entre cíbridos control y mutantes. Sin embargo, se observó un retraso significativo en las cinéticas de ensamblaje de los complejos I, III y IV individuales como consecuencia de la mutación en *MT-CYB* (Gil Borlado et al, 2010).

2.3.1 Niveles estacionarios de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en *MT-CYB*.

En primer lugar se analizaron los niveles estacionarios de los complejos individuales y supercomplejos de CRM mediante BN-PAGE en combinación con *Western-blot*, utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9 y NDUFS1 del complejo I, SDHA del complejo II, CORE2 y RISP del complejo III y COX1, COX4, COX5A y COX6C del complejo IV (Figura 21). En geles de 1D-BN-PAGE (Figura 21A), no se observaron diferencias en los niveles estacionarios de los complejos I, III y IV libres, ni en los supercomplejos mitocondriales I+III₂+IV_n y III₂+IV entre los cíbridos mutantes y las células 143B, usadas como control. En paralelo se realizó un ensayo de actividad en gel del complejo I, el cual también mostró niveles similares entre las células mutantes y las control (Figura 21A). Un ensayo paralelo de

2D-BN/SDS-PAGE (Figura 21B) mostró resultados similares para todas las subunidades analizadas excepto para las subunidades COX4 y COX6C, las cuales se encontraron a niveles reducidos en los supercomplejos III_2+IV y $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ de las células mutantes en *MT-CYB*. Además, se observó una leve acumulación de

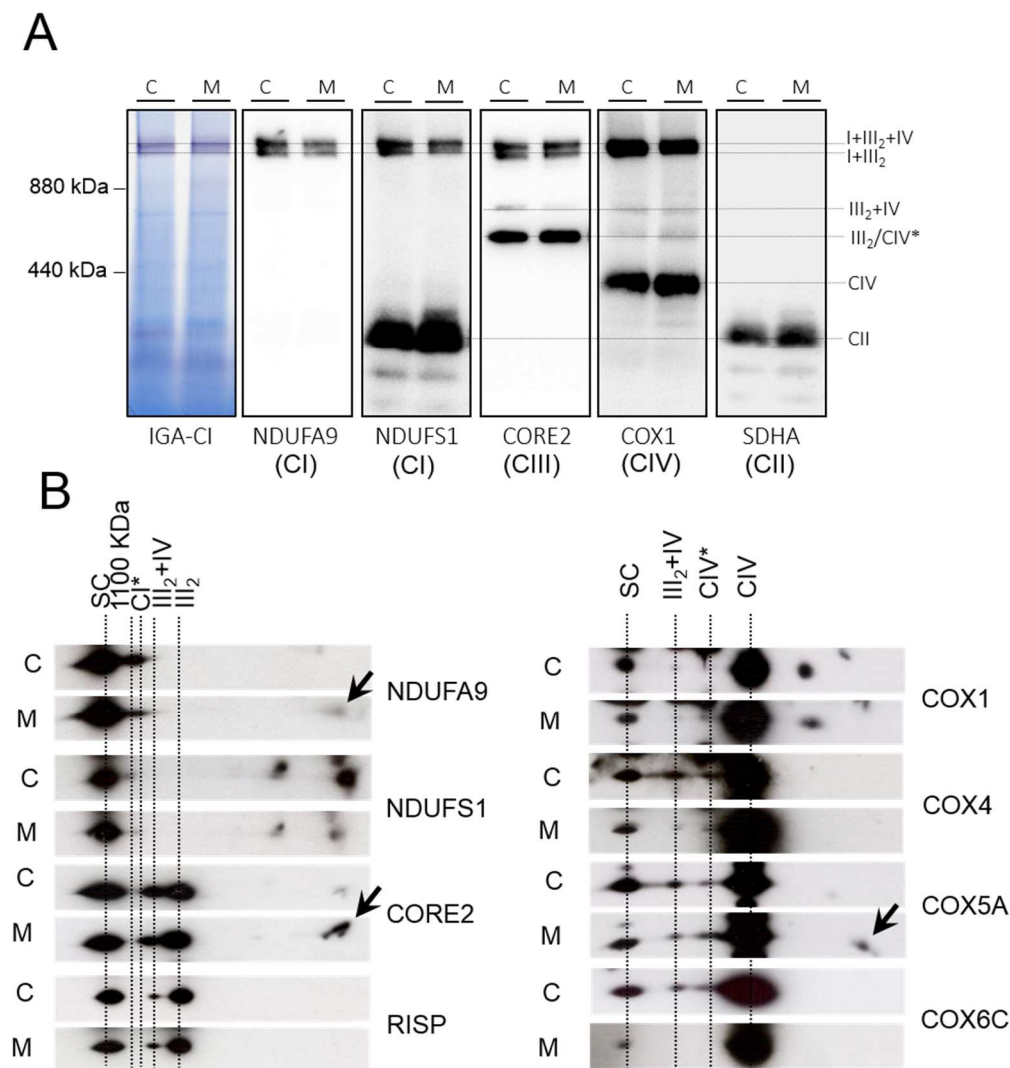


Figura 21. Niveles estacionarios de los complejos y supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en *MT-CYB*. Se analizaron 60 μg de mitocondria purificada mediante tratamiento con digitonina de cíbridos portadores de la mutación homoplásmica *m.15533A>G* en el gen *MT-CYB* (M) y células 143B (C). **(A)** Análisis de los niveles estacionarios de los complejos y supercomplejos de CRM mediante 1D-BN-PAGE y ensayo de actividad en gel del complejo I (IGA-CI). A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular **(B)**. Análisis de los niveles estacionarios mediante 2D-BN/SDS-PAGE en células 143B (C) y mutantes (M). $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ o SC, supercomplejo que contiene a los complejos I, III y IV; $\text{I}+\text{III}_2$, supercomplejo que contiene a los complejos I y III; 1100 kDa, intermediario de 1100 kDa del complejo I; CI^* , intermediario de 830 kDa del complejo I; III_2 , dímero del complejo III; III_2+IV , supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV, complejo IV; CIV^* , posible dímero del complejo IV; CII, complejo II. Las flechas indican la acumulación de subcomplejos de bajo peso molecular.

subcomplejos de bajo peso molecular que contenían las subunidades NDUFA9, CORE2 y COX5A (Figura 21B).

2.3.2 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo I en los supercomplejos mitocondriales de cíbridos mutantes en *MT-CYB*.

Para analizar la incorporación de subunidades del complejo I en los cíbridos mutantes en *MT-CYB* se realizó un tratamiento de 6 días con doxiciclina, seguido de ensayos de BN-PAGE y *Western-blot* utilizando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFA9, NDUFV1 y NDUF51.

En geles de 1D-BN-PAGE en los que se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática en gel del complejo I (IGA-CI), a tiempo 0 horas se observó una ausencia de dicha actividad en los supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n (indicados como SC) de los cíbridos mutantes, (Figura 22A). La actividad del complejo I aparecía de forma residual a tiempo 6-15 horas en una banda de 1100 kDa compatible con el complejo I individual. Dicha actividad se comenzó a detectar a niveles bajos en los supercomplejos de células mutantes a las 48 horas del tratamiento con doxiciclina, la cual fue en aumento gradualmente, pero sin llegar a recuperar los niveles estacionarios (SS) a las 96 horas (Figura 22A). En geles de 2D-BN/SDS-PAGE una vez restaurada la traducción mitocondrial se observó la acumulación de la subunidad NDUFA9 en el intermediario de ~830 kDa (CI*) a tiempo 0 horas. A las 6 horas post-tratamiento, dicho intermediario se desplazaría hacia un intermediario de ~1100 kDa para finalmente incorporarse a los supercomplejos a las 15-24 horas post-tratamiento, alcanzando los niveles estacionarios a las 96 horas (Figura 22B). Dicha cinética de incorporación fue similar entre cíbridos control y mutante (Figura 22C). A tiempo 0 horas, las subunidades NDUF51 y NDUFV1 se detectaron acumuladas en subcomplejos de bajo peso molecular (sub CI, Figura 22B), desplazándose hacia el intermediario de 1100 kDa a tiempo 6 horas y luego a los supercomplejos a las 24-48 horas post-tratamiento (Figura 22B). Las cinéticas de incorporación a los supercomplejos de ambas subunidades se encontraron inicialmente retardadas en células mutantes respecto a los controles, aunque a tiempo 96 horas alcanzaron los niveles estacionarios (Figura 22C).

Estos resultados sugieren que la mutación m.15533A>G en la subunidad citocromo b del complejo III podría provocar un retraso en la incorporación del módulo N catalítico del complejo I a los supercomplejos.

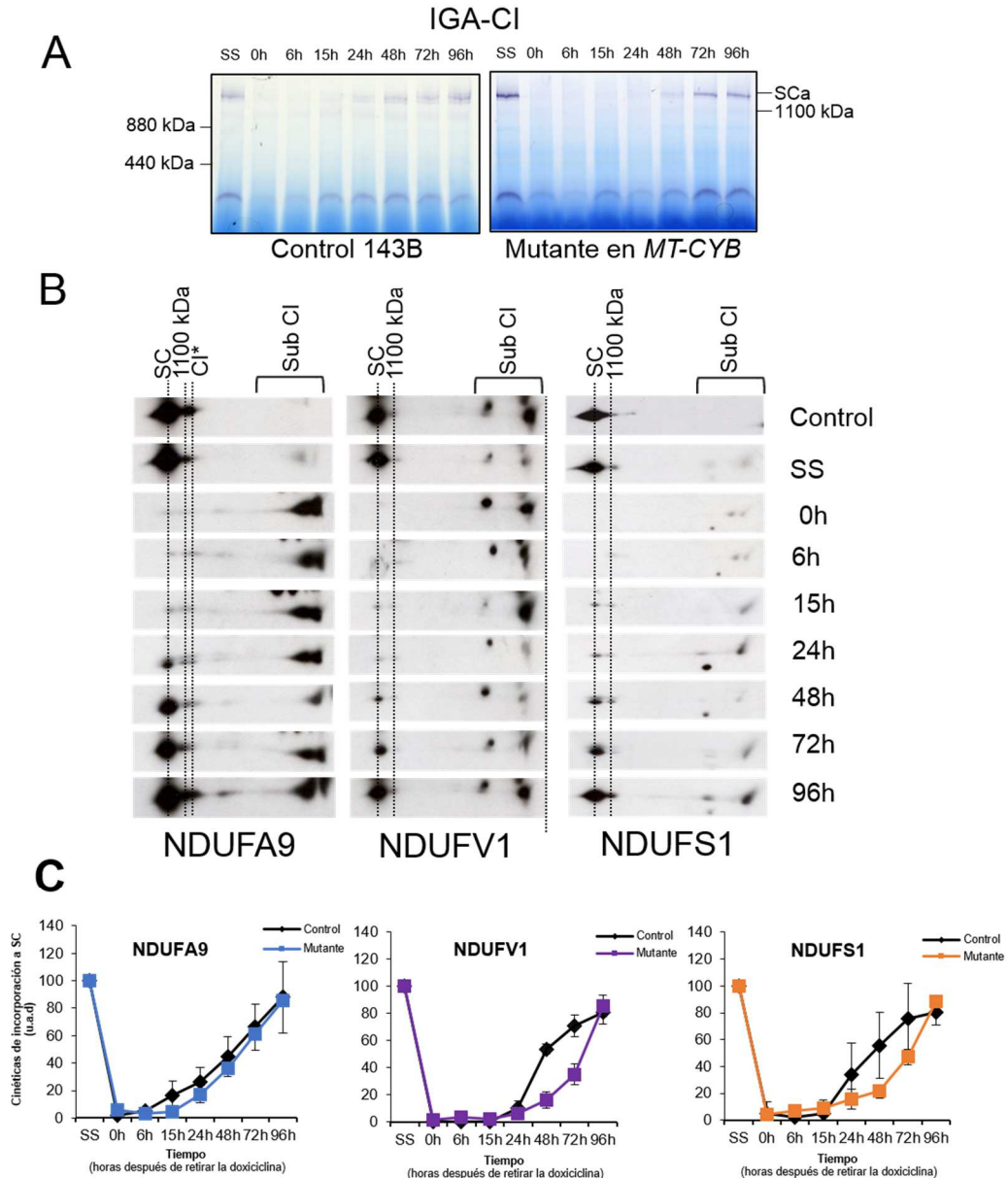


Figura 22. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo I en los supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-CYB*. (A) Se crecieron células 143B y cíbridos mutantes en *MT-CYB* durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciplina. Tras restaurar la traducción mitocondrial, se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 60µg de proteína mitocondrial en geles de BN-PAGE con un gradiente del 3-13% de acrilamida/bisacrilamida seguido de un ensayo de actividad en gel del complejo I (IGA-CI). SCa, actividad del complejo I en los supercomplejos. A la derecha se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. (B) Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFV1, NDUFV1 y NDUFV1 del complejo I. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; CI*, intermediario de 830 kDa del complejo I; 1100 kDa, intermediario de 1100 kDa del complejo I; SS, niveles estacionarios de los complejos de CRM en cíbridos mutantes sin tratar con doxiciplina. (C) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot* de al menos dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades NDUFV1, NDUFV1 y NDUFV1 en células control corresponden a las descritas en las Figuras 6B y 13C.

2.3.3 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo III en los supercomplejos mitocondriales de híbridos mutantes en *MT-CYB*.

A continuación se analizó la integración de las subunidades CORE2 y RISP tanto en el dímero del complejo III como en los supercomplejos III_2+IV y $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$. Después de 6 días de tratamiento con doxiciclina, se observó una reducción del ~70-80% en los niveles de las subunidades CORE2 y RISP en el dímero del complejo III respecto a las células mutantes en *MT-CYB* sin tratar (SS, Figuras 23A y 23B). Al iniciarse la síntesis *de novo* del complejo III tras la retirada de la doxiciclina, comenzaron a incrementarse gradualmente los niveles del dímero del complejo III (CIII_2). Las cinéticas de incorporación de las subunidades CORE2 y RISP en dicha estructura fueron similares entre células control y mutantes (Figura 23B).

En relación a su incorporación en el supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$, se observó la presencia en dicha estructura de la subunidad CORE2 a las 15-24 horas del tratamiento con doxiciclina y de la subunidad RISP a las 48 horas. Aunque las cinéticas de ambas subunidades sufrieron un leve retraso inicial en su incorporación a los supercomplejos en las células mutantes, ambas subunidades alcanzaron niveles comparables a los de las células control a las 96h tras el tratamiento con doxiciclina. Al igual que en células control, la incorporación de la subunidad RISP en el supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ del mutante en *MT-CYB* se encontró retardada respecto a CORE2 (Figuras 23A y 23B). Con respecto al supercomplejo III_2+IV , la subunidad CORE2 se detectó en dicha estructura las 24-48 horas del tratamiento con doxiciclina alcanzando los niveles estacionarios a las 96 horas. La subunidad RISP se comenzó a detectar en el supercomplejo III_2+IV a las 72-96 horas del tratamiento, sin llegar a alcanzar los niveles estacionarios. Ambas subunidades presentaron cinéticas de incorporación al supercomplejo III_2+IV levemente retardadas con respecto a las células control (Figuras 23B).

Estos resultados sugieren que la mutación m.15533A>G en *MT-CYB* afectaría a la formación de los supercomplejos III_2+IV y $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ pero sin afectar a la biogénesis del complejo III. Aunque dicha mutación produce un leve retraso en la incorporación de subunidades o subcomplejos del complejo III en los supercomplejos $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ y III_2+IV , no parece impedir la correcta formación de estas estructuras, produciéndose la formación del supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ en un paso previo a la formación del supercomplejo III_2+IV , al igual que se observaba en células control.

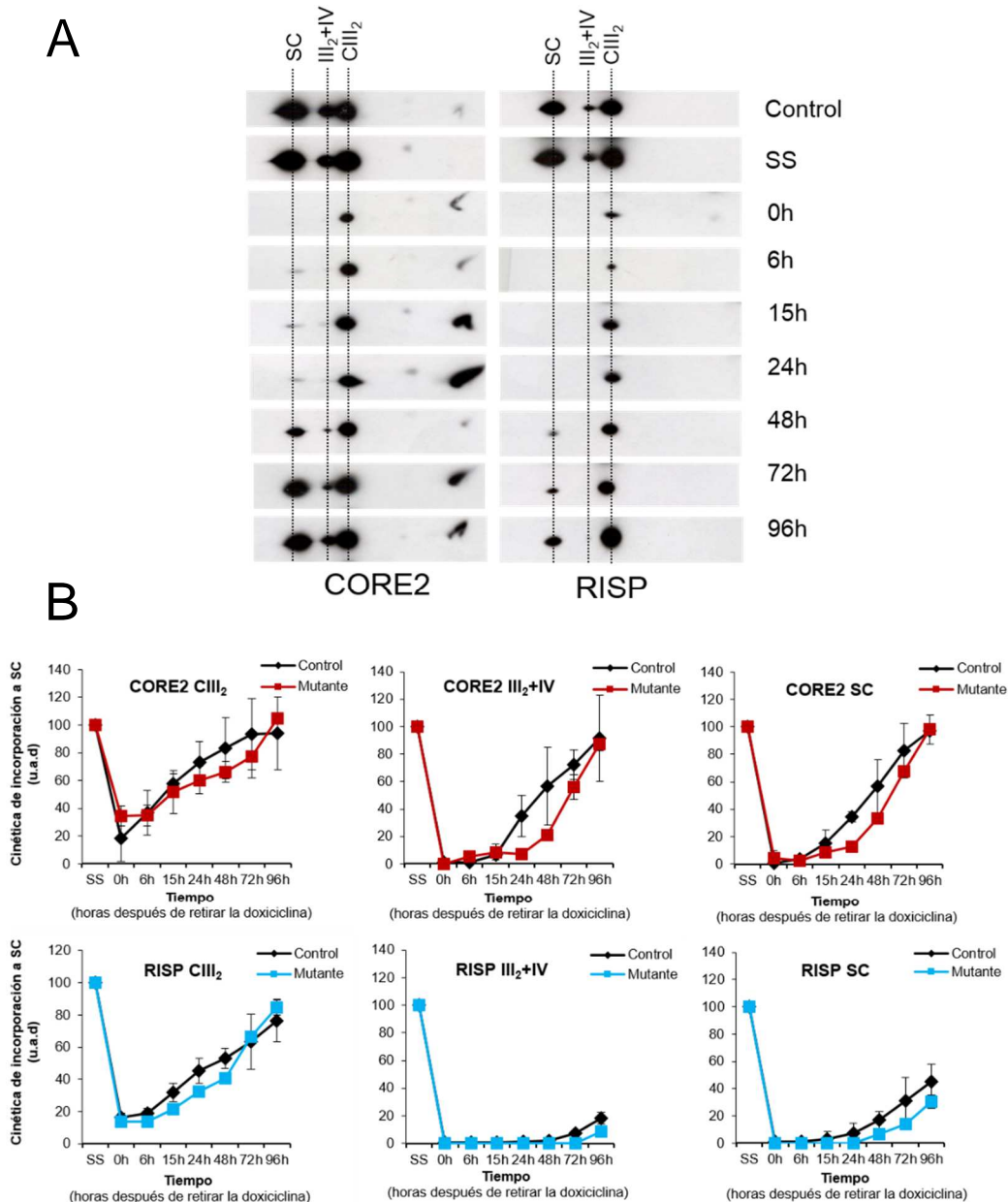


Figura 23. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo III en los supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-CYB*. (A) Los cíbridos mutantes se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen las subunidades CORE2 y RISP del complejo III. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIII₂, dímero del complejo III. SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en cíbridos mutantes sin tratar con doxiciclina. (B) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blots* de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentajes relativos respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades CORE2 y RISP en células control corresponden a las descritas en la Figura 7C.

2.3.4 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo IV en los supercomplejos mitocondriales de híbridos mutantes en *MT-CYB*.

Finalmente, se analizó en los híbridos mutantes en *MT-CYB* la incorporación tanto en el complejo IV libre como en los supercomplejos $\text{III}_2\text{+IV}$ y $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$ de las subunidades de ensamblaje temprano COX1, COX4 y COX5A, y de la subunidad COX6C, que se inserta en el complejo IV en una etapa tardía (Figura 24). Tras 6 días de tratamiento con doxiciclina (Figura 25, tiempo 0h), se observó una reducción del 70-80% en los niveles de todas las subunidades COX en el complejo IV libre en comparación con las células mutantes sin tratar (SS), de forma similar a lo que ocurría en las células control 143B. Dichos niveles se incrementaron gradualmente después de restaurarse la traducción mitocondrial, presentando todas las subunidades COX cinéticas de incorporación en el complejo IV similares entre células mutantes y controles (Figuras 24 y 25). En relación a la incorporación de las subunidades COX en los supercomplejos $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$ (SC) (Figura 26), las subunidades COX1 y COX5A comenzaron a detectarse en dichas estructuras a las 48 horas después del tratamiento con doxiciclina (Figuras 26 y 27A), sin llegar a alcanzar los niveles estacionarios a las 96 horas. Las subunidades COX4 y COX6C, se detectaron en el supercomplejo $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$ a niveles muy disminuidos a las 72 y 96 horas del tratamiento con el antibiótico, respectivamente (Figuras 26 y 27). La subunidad COX1 presentó una cinética de ensamblaje en los supercomplejos similar a la de los controles. Sin embargo, las subunidades COX4, COX5A y COX6C presentaron un claro retraso en su incorporación a los supercomplejos de los híbridos mutantes con respecto a los controles. Con respecto a la formación del supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$, las subunidades COX1, COX4 y COX5A se detectaron en dichas estructuras a altas exposiciones en las células mutantes sin tratar con doxiciclina (SS), pero no así la subunidad COX6C (Figuras 27A). Las subunidades COX1 y COX5A comenzaron a detectarse en el supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ a las 48-72 horas post-tratamiento, mientras que la subunidad COX4 se detectó en dicho supercomplejo a niveles muy disminuidos a las 96 horas del tratamiento con doxiciclina (Figuras 27A y 27B). Por el contrario, las subunidades COX4 y COX5A presentaron un retraso en su incorporación al supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ con respecto a la cinética descrita en los controles. La subunidad COX1 presentó una cinética de ensamblaje en los supercomplejos $\text{III}_2\text{+IV}_n$ de híbridos mutantes en *MT-CYB* similar a la de los controles. Estos resultados sugieren que la mutación m.15533A>G en la subunidad citocromo b del complejo III podría afectar a la incorporación de

subunidades del complejo IV en los supercomplejos I+III₂+IV_n y III₂+IV pero sin afectar a la formación del complejo IV libre. De igual forma que se observaba con las subunidades del complejo III, la formación del supercomplejo III₂+IV en las células mutantes parece ocurrir con posterioridad a la formación del supercomplejo I+ III₂+IV_n.

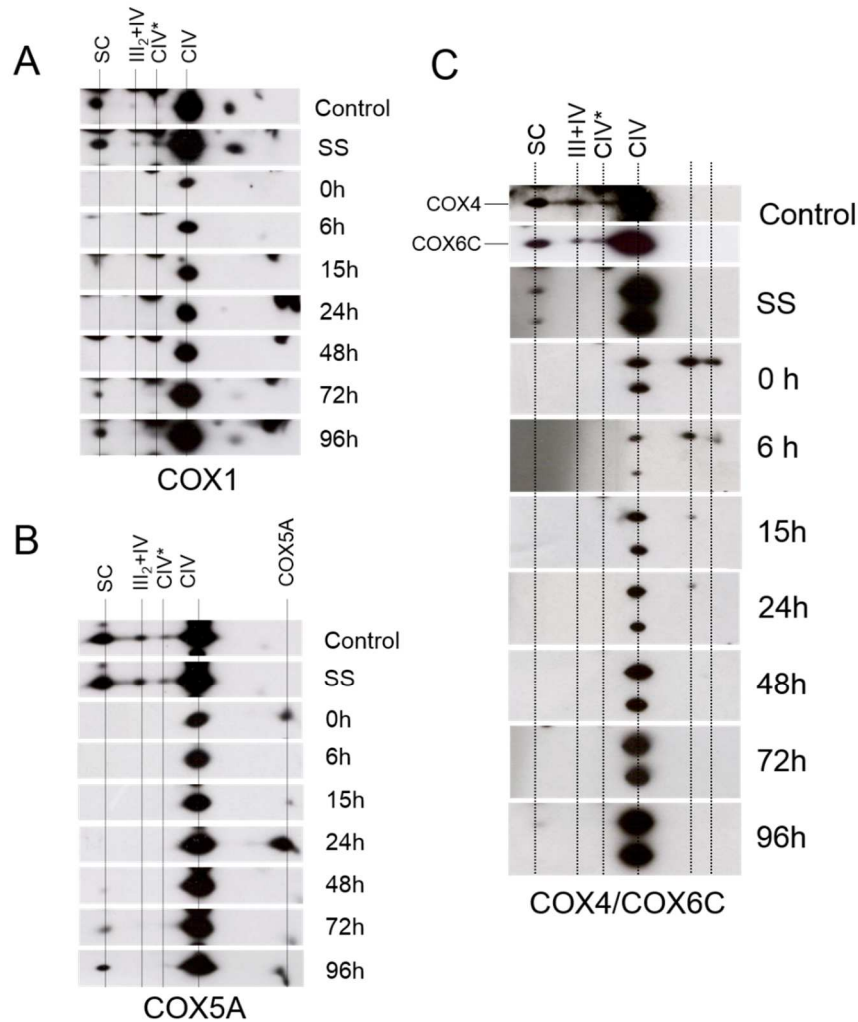


Figura 24. Análisis mediante 2D-BN/SDS-PAGE de la incorporación de subunidades del complejo IV en los supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-CYB*. Los cíbridos mutantes se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial, se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen la subunidades COX1 (A), COX5A (B) y COX4 y COX6C (C) del complejo IV. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV, complejo IV; CIV*, posible dímero del complejo IV. SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en cíbridos mutantes sin tratar con doxiciclina.

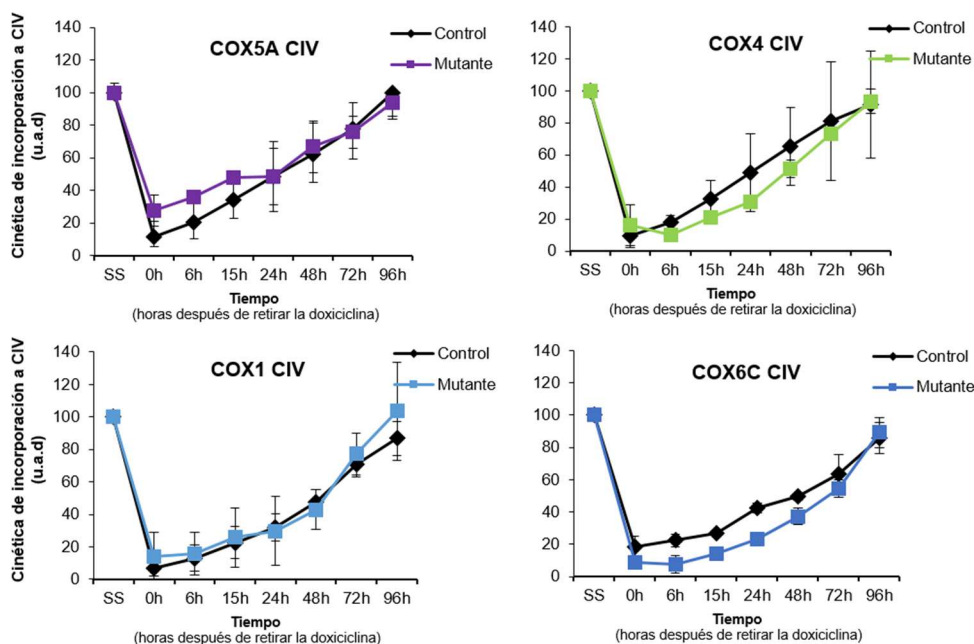


Figura 25. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo IV libre al complejo IV de cíbridos mutantes en *MT-CYB*. Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blots* de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades COX1, COX4, COX5A y COX6C en células control corresponden a las descritas en la Figura 9B.

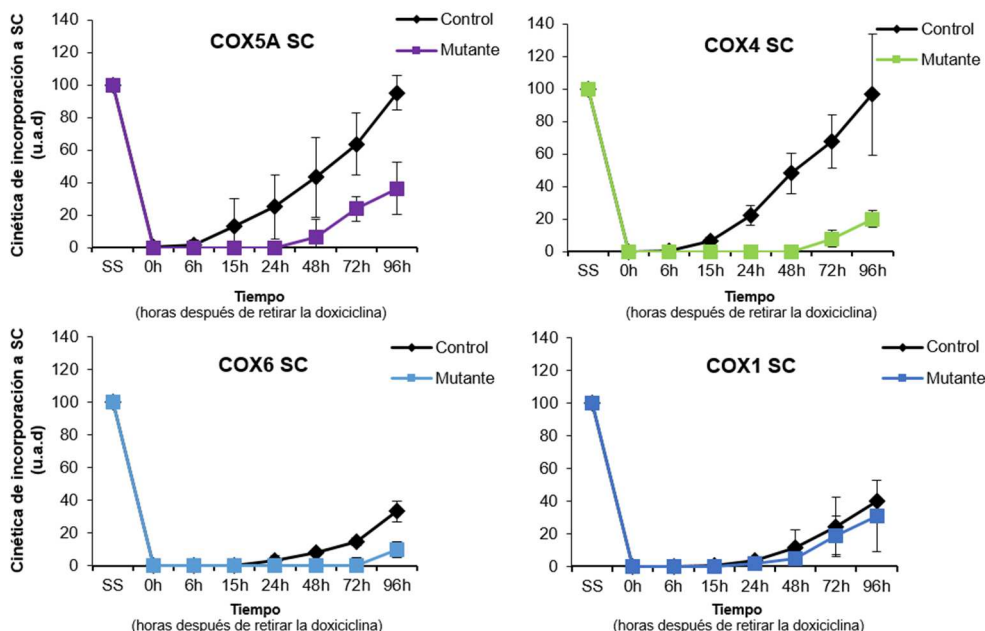


Figura 26. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo IV en los supercomplejos $I+III_2+IV_n$ de cíbridos mutantes en *MT-CYB*. Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blots* de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades COX1, COX4, COX5A y COX6C en células control corresponden a las descritas en la Figura 9B.

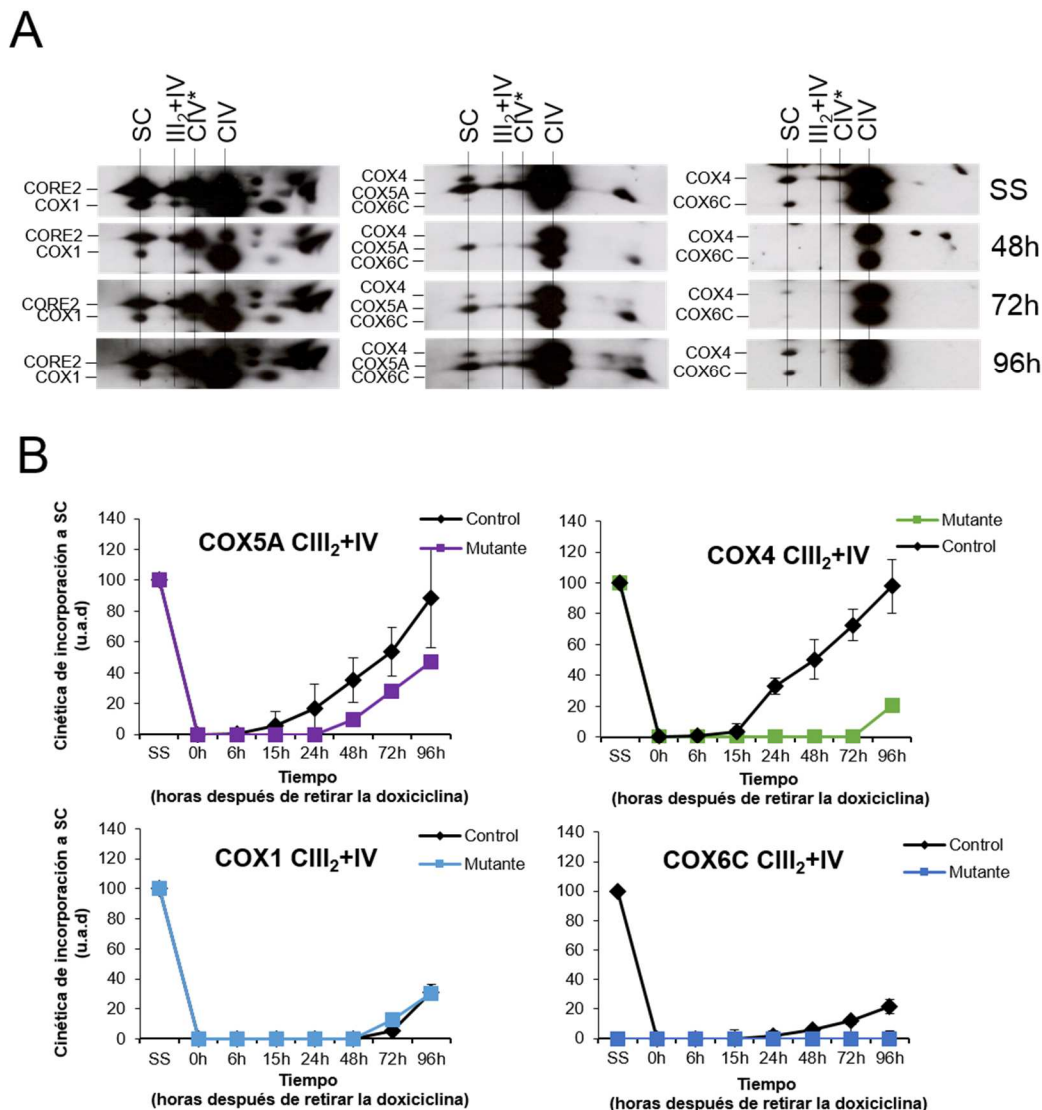


Figura 27. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo IV en el supercomplejo III_2+IV de cíbridos mutantes en *MT-CYB*. (A) Altas exposiciones de los tiempos de 48, 72 y 96 horas y SS pertenecientes al experimento mostrado en la figura 23. (B) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot*s de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentaje relativo respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades COX1, COX4, COX5A y COX6C en células control corresponden a las descritas en la Figura 9B.

2.3.5 Formación del respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en *MT-CYB*

Con el fin de elaborar la ruta de ensamblaje del respirasoma mitocondrial en los cíbridos mutantes en *MT-CYB*, se realizó un análisis comparativo de las cinéticas de incorporación a los supercomplejos $I+III_2+IV_n$ (SC) de todas las subunidades de CRM analizadas (Figura 28). Al igual que ocurría en las células control, en el mutante de citocromo b la subunidad NDUFA9 del complejo I se encontraría inicialmente

estabilizada en el subcomplejo de 830 kDa del complejo I (o SC1). Este intermediario se desplazaría hacia un intermediario de ~1100 kDa y posteriormente, hacia la posición del supercomplejo I+III₂+IV_n en paralelo a la incorporación de la subunidad CORE2 del complejo III, (Figura 28). Las cinéticas de incorporación a los supercomplejos de las subunidades NDUFS1 y NDUFV1 del módulo deshidrogenasa del complejo I estaban retrasadas respecto a la cinética de la subunidad CORE2 de complejo III, por lo que la incorporación del módulo N del complejo I parecía ocurrir en un paso posterior a la incorporación de CORE2. La actividad NADH deshidrogenasa del complejo I se detectó con posterioridad a la incorporación de las subunidades NDUFS1 y NDUFV1, lo que implicaría la existencia de un intermediario de ensamblaje de supercomplejos formado por el complejo I ensamblado e inactivo y el complejo III parcialmente ensamblado e inactivo, al que se uniría en un paso posterior la subunidad catalítica RISP del complejo III. Y las subunidades COX1 y COX5A del complejo IV, formando un supercomplejo I+III₂+IV_n parcialmente ensamblado. Finalmente, se incorporaría la subunidad estructural COX4 y en un último paso la subunidad COX6C (Figura 28).

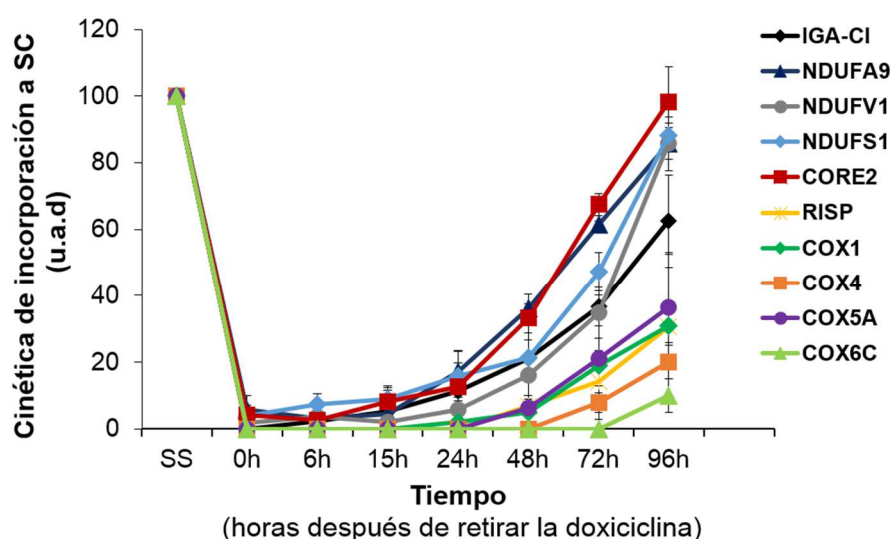


Figura 28. Formación el respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en *MT-CYB*. Análisis comparativo de las cinéticas de incorporación a los supercomplejos I+III₂+IV_n obtenidas de cada una de las subunidades de estudio. Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d)

2.4 Análisis en cíbridos mutantes en el gen *MT-CO2*.

Para estudiar el efecto de la ausencia del complejo IV sobre el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales, se analizaron cíbridos portadores de la mutación homoplásmica m.7896G>A en el gen *MT-CO2*. Dicha mutación fue descrita en un paciente que presentó una enfermedad multisistémica de inicio temprano con hipotonía, retraso psicomotor, acidosis láctica, cardiopatía hipertrófica leve y retinopatía pigmentaria asociadas a un déficit enzimático aislado del complejo IV en músculo (Campos et al 2001). Dicha mutación genera un cambio de triptófano por un codón de terminación prematuro en la posición 104 (p.W104X) de la subunidad COX2 (Tabla 2).

2.4.1 Niveles estacionarios de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en *MT-CO2*.

En primer lugar se analizaron los niveles estacionarios de los complejos individuales y supercomplejos de CRM en los cíbridos mutantes en *MT-CO2* respecto a su correspondiente control isogénico. Los análisis en geles de 1D-BN-PAGE en combinación con ensayos de actividad en gel mostraron la presencia de la actividad del complejo I en el supercomplejo I+III₂ en los cíbridos mutantes, así como en una banda de menor peso molecular (~1100 kDa) que podría ser compatible con el complejo I individual (Figura 29A). El análisis paralelo de *Western-blot* n geles de 1D y 2D de BN-PAGE, utilizando anticuerpos que reconocen subunidades de distintos complejos de CRM (NDUFA9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS4 y NDUFV1 del complejo I, CORE2 y RISP del complejo III y COX1, COX2, COX4, COX5A y COX6C del complejo IV), mostraron una pérdida del complejo IV y de los supercomplejos que lo contienen (III₂+IV y I+III₂+IV_n), asociada a una acumulación del supercomplejo I+III₂, de la banda de ~1100 kDa y del dímero del complejo III (Figuras 29A y 29B). Sorprendentemente, en el supercomplejo I+III₂ también se detectó a bajos niveles la subunidad COX1 del complejo IV (Figura 29A y 30A).

El ensayo mediante 2D-BN/SDS-PAGE mostró la acumulación de subcomplejos de bajo peso molecular que contenían a las subunidades CORE2 y RISP del complejo III. Además, dicho análisis confirmó que la ausencia del complejo IV en los cíbridos mutantes (M), se debe a la pérdida de la subunidad COX2 (Figura 29B). Como consecuencia de la ausencia del complejo IV, el resto de las subunidades COX analizadas (COX1, COX4, COX5A y COX6C) se detectaron bien en sus formas monoméricas o bien como una acumulación de subcomplejos del complejo IV. A

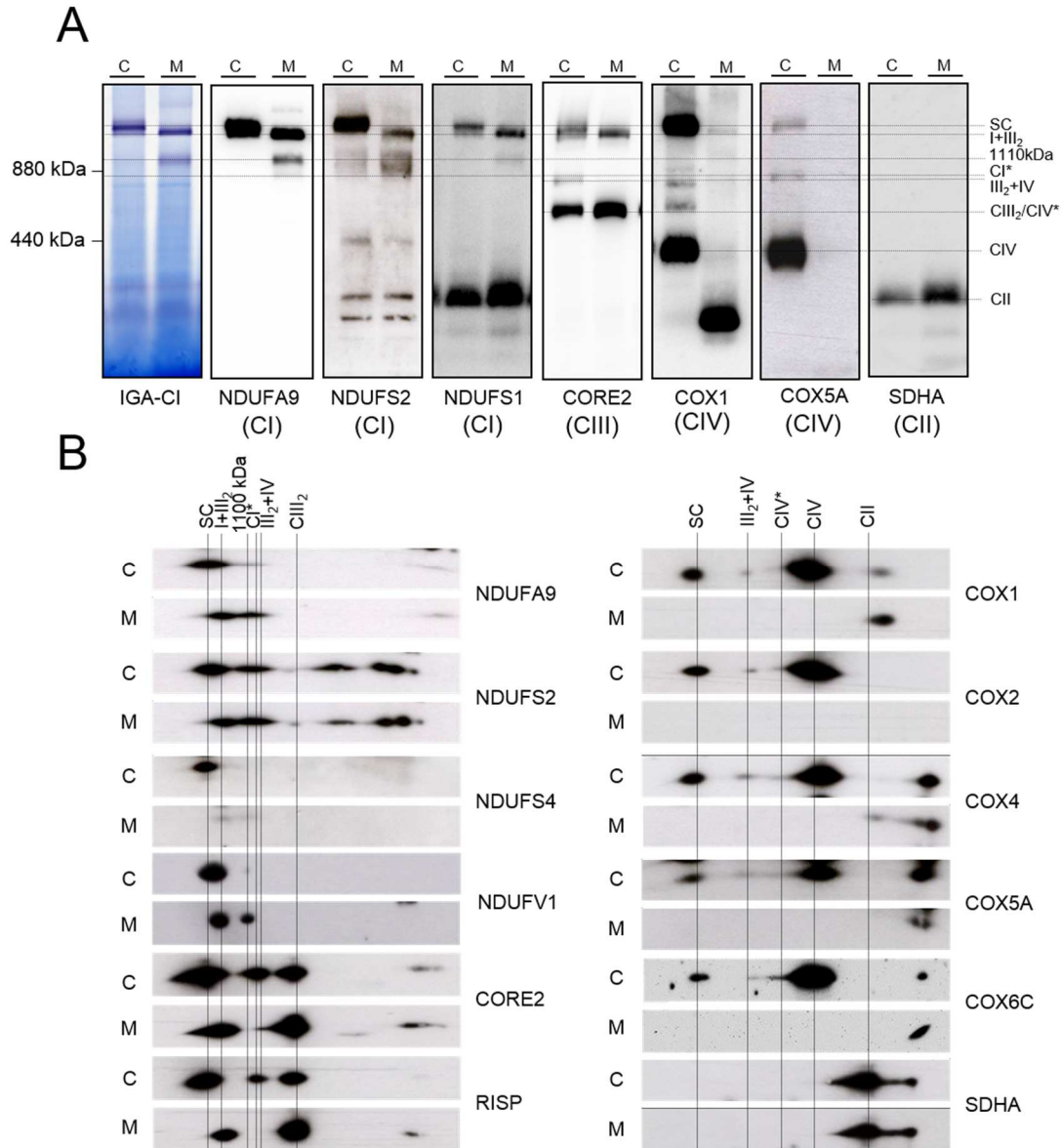


Figura 29. Niveles estacionarios de los complejos y supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en *MT-CO2*. Se analizaron mediante BN-PAGE 60µg de mitocondria purificada de cíbridos mutantes portadores de la mutación homoplásmica m.7896G>A en *MT-CO2* (M) y su correspondiente control isogénico (C). A continuación se realizó un análisis de *Western-blot* utilizando anticuerpos contra las subunidades OXPHOS indicadas. **(A)** Niveles estacionarios de los complejos y supercomplejos de CRM mediante 1D-BN-PAGE y ensayo de actividad en gel del complejo I (IGA-CI). A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. **(B)** Análisis de los niveles estacionarios mediante 2D-BN/SDS-PAGE en cíbridos control (C) y mutantes (M). SC, supercomplejos que contienen a los complejos I, III y IV; I+III₂, supercomplejo que contiene a los complejos I y III; CI*, intermediario de 830 kDa del complejo I; 1100 kDa, intermediario de 1100 kDa del complejo I; CIII₂, dímero del complejo III; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV*, posible dímero del complejo IV; CIV, complejo IV; CII, complejo II.

exposiciones altas (Figura 30A), las subunidades COX1 y COX4 se detectaron a bajos niveles en el supercomplejo I+III₂, sin apreciarse la presencia de las subunidades COX5A y COX6C. En cíbridos mutantes en *MT-CO2* los niveles estacionarios del complejo II fueron similares a los controles y no colocalizaron con los supercomplejos (Figura 29 y 30B). A altas exposiciones, se detectaron trazas del complejo II en estructuras de alto peso molecular que podrían representar su colocalización con el supercomplejo I+III₂+IV_n. Sin embargo, tanto la abundancia como la movilidad electroforética de ese punto en particular (denominado SCII) no se vieron afectadas por la pérdida del complejo IV en la línea celular mutante (Figura 30B). Estos resultados indicarían que el complejo II no es un componente funcional del supercomplejo I+III₂+IV_n en células humanas.

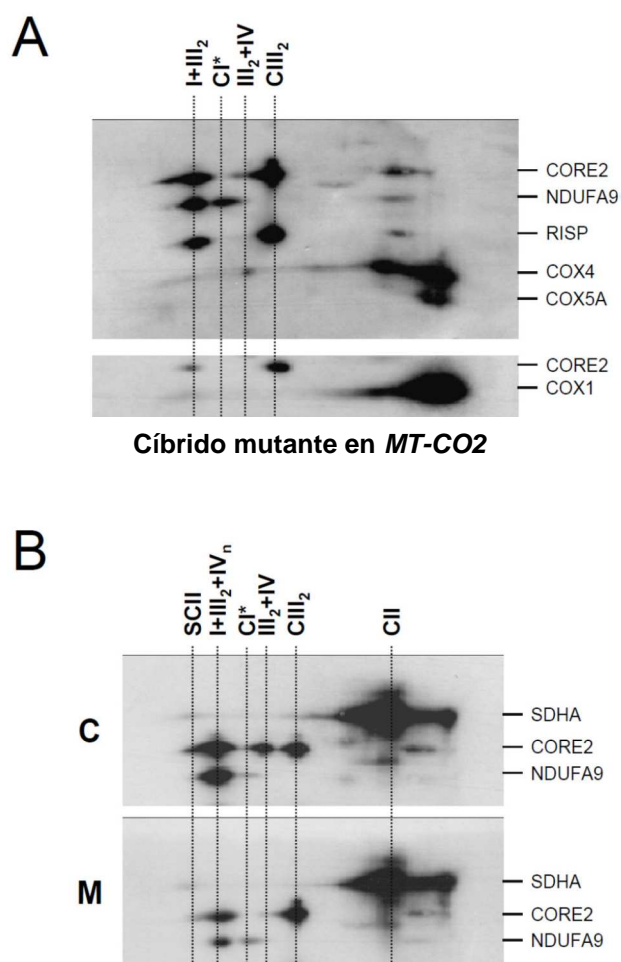


Figura 30. Composición de los supercomplejos mitocondriales en cíbridos mutantes en *MT-CO2*. Se analizaron 60 µg de mitocondrias purificadas de cíbridos mutantes en *MT-CO2* (M) y su correspondiente control isogénico (C) mediante 2D-BN/SDS-PAGE, en combinación con *Western-blot* utilizando altas exposiciones de los anticuerpos contra las subunidades OXPHOS indicadas. **(A)** Posición relativa de las subunidades COX respecto a las subunidades NDUFA9 del complejo I y CORE2 y RISP del complejo III en los cíbridos mutantes **(B)** Posición relativa de la subunidad SHDA del complejo II en cíbridos control y mutantes en *MT-CO2*. SCII, estructura de alto peso molecular que contiene al complejo II; I+III₂+IV_n, supercomplejos que contienen a los complejos I, III y IV; CI*, intermediario de 830 kDa y 1100 kDa del complejo I; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIII₂, dímero del complejo III; CII, complejo II.

2.4.2 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo I en el supercomplejo I+III₂ de cíbridos mutantes en *MT-CO2*.

Para definir la ruta de biogénesis del supercomplejo I+III₂ en ausencia del complejo IV, se realizaron ensayos de doxiciclina en los cíbridos mutantes en *MT-CO2* y posteriormente las fracciones mitocondriales se analizaron mediante BN-PAGE en combinación con ensayos de actividad en gel y *Western-blot*, utilizando anticuerpos que reconocen subunidades implicadas en diferentes etapas del ensamblaje del complejo I (Figura 31). Tras 6 días de tratamiento con doxiciclina (0h), no se observó la actividad en gel del complejo I en el supercomplejo I+III₂. Dicha actividad comenzó a restaurarse a las 24-48 horas de la retirada del antibiótico, con cinéticas de recuperación similares entre cíbridos mutantes y control (Figura 31A). Además, se observó actividad de complejo I en la banda de ~1100 kDa que podría corresponder al complejo I libre. Dicha actividad se detectó a niveles residuales a tiempo 0 horas y dichos niveles disminuyeron gradualmente hasta las 96 horas después del tratamiento con doxiciclina, al mismo tiempo que aumentó la actividad NADH deshidrogenasa en los supercomplejos.

Tras restaurarse la traducción mitocondrial, el análisis de la subunidad NDUFS2 de ensamblaje temprano del complejo I en geles de 2D-BN/SDS-PAGE mostró la acumulación de dicha subunidad en el intermediario de ~830 kDa (CI*) a tiempo 0 horas. Dicha señal se desplazó hacia el intermediario de ~1100 kDa, para luego incorporarse a los supercomplejos a las 15 horas post-tratamiento, alcanzando los niveles estacionarios a las 96 horas (Figuras 31B y 31D). La cinética de incorporación de la subunidad NDUFS2 al supercomplejo I+III₂ fue similar entre células mutantes y células control (Figura 31D).

En paralelo, se analizaron las cinéticas de ensamblaje de las subunidades NDUFV1 y NDUFS1 del módulo catalítico N del complejo I en el supercomplejo I+III₂. Ambas subunidades se detectaron a tiempo 0 horas en estructuras de bajo peso molecular, los cuales se desplazaron a tiempo 6 horas hacia el intermediario de ~1100 kDa del complejo I (Figuras 31B y 31C). Posteriormente a las 24 horas del tratamiento con doxiciclina, las señales se detectaron en el supercomplejo I+III₂ (Figuras 31B y 31C). De nuevo, ambas subunidades presentaron cinéticas de incorporación al supercomplejo I+III₂ similares a las observadas en células control (Figura 31D).

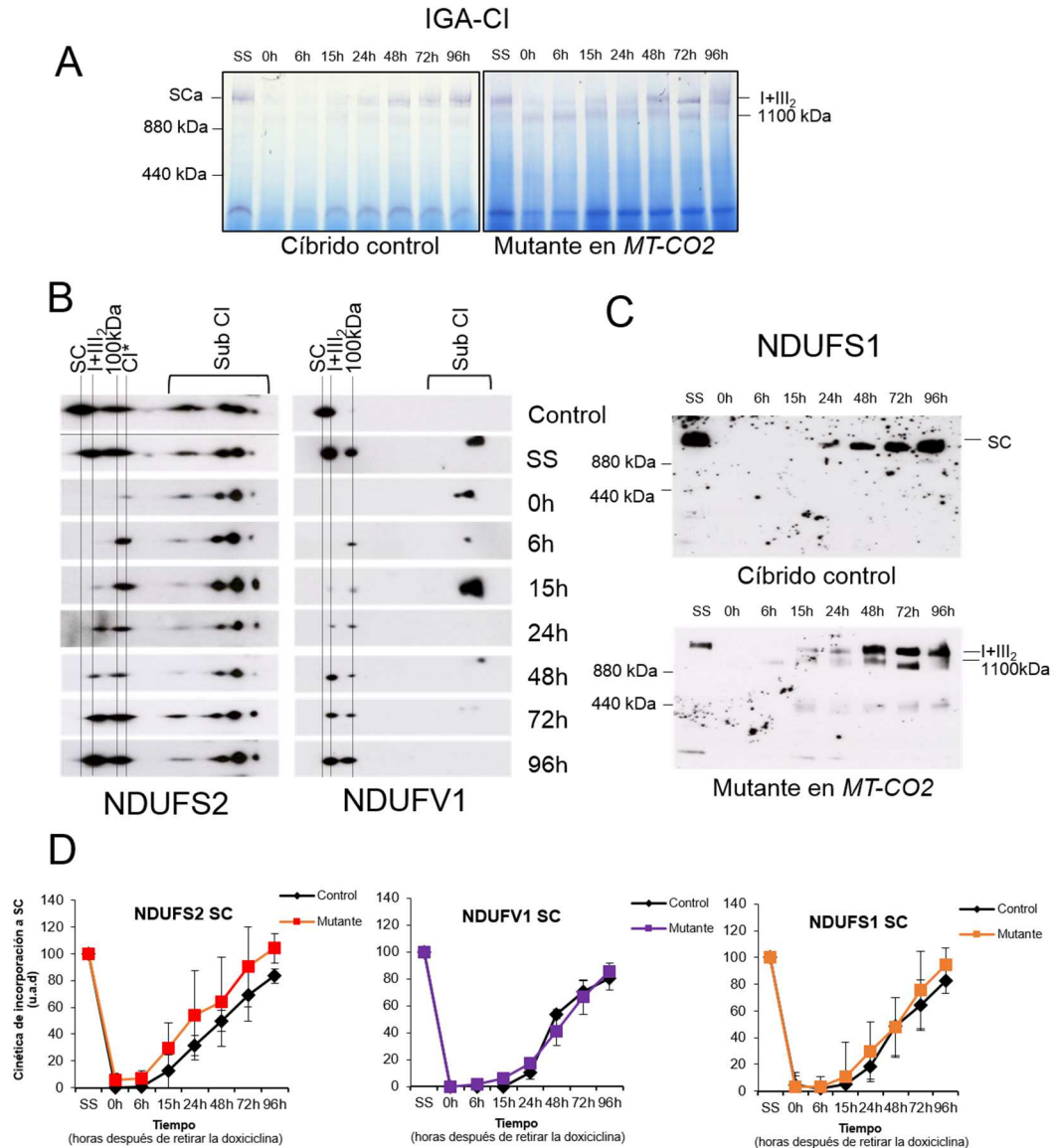


Figura 31. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo I en el supercomplejo I+III₂ de cíbridos mutantes en *MT-CO2*. (A) Los cíbridos control y mutantes en *MT-CO2* se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxiciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial, se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 60µg de proteína mitocondrial en geles de BN-PAGE con un gradiente del 3-13% de acrilamida/bisacrilamida seguido de ensayos de actividad en gel de complejo I (IGA-CI). SCa, actividad del complejo I en los supercomplejos I+III₂+IV_n. A la derecha se indican los pesos moleculares correspondientes a la ferritina, utilizada como marcador de peso molecular. (B). Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen las subunidades NDUFV2 y NDUFV1 del complejo I. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; I+III₂, supercomplejos que contienen a los complejos I y III; 1100 kDa, intermediario de 1100 kDa del complejo I; CI*, subcomplejo de 830 kDa del complejo I; SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en cíbridos mutantes sin tratar con doxiciclina. (C) Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 1D-BN-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando un anticuerpo que reconoce la subunidad NDUFS1 del complejo I. (D) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *western-blots* de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentajes relativos respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades NDUFV2, NDUFV1 y NDUFS1 en células control corresponden a las descritas en las Figuras 6B y 13C.

Aunque estos hallazgos sugieren que la presencia del complejo IV no parece ser necesaria para la formación del supercomplejo I+III₂, la acumulación anómala del intermediario de ensamblaje de ~1100kDa podría indicar fallos en la correcta biogénesis del supercomplejo I+III₂ en ausencia del complejo IV.

2.4.3 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo III en el supercomplejo I+III₂ de cíbridos mutantes en *MT-CO2*.

Posteriormente se estudió la integración de las subunidades CORE2 y RISP tanto en el dímero del complejo III como en el supercomplejo I+III₂ (Figura 32). Después de 6 días de tratamiento con doxiciclina (0h), se observó una disminución del ~70% en los niveles de ambas subunidades en el dímero del complejo III respecto a las células sin tratar (SS), sin detectarse la presencia de estas subunidades en el supercomplejo I+III₂ (Figuras 32A y 32B). Una vez restaurada la traducción mitocondrial se observó un aumento gradual en los niveles de ambas subunidades en el dímero del complejo III, presentando cinéticas de incorporación al complejo III similares entre los cíbridos mutantes y los controles (Figura 32B).

Respecto a la inserción de estas subunidades en el supercomplejo I+III₂, CORE2 se detectó en dicha estructura a las 15-24 horas del tratamiento con doxiciclina, alcanzando los niveles estacionarios a las 96 horas. La subunidad RISP de nuevo apareció retardada en el supercomplejo I+III₂ con respecto a CORE2, puesto que comenzó a detectarse en dicha estructura a las 48 horas del tratamiento con doxiciclina, pero sin alcanzar los niveles estacionarios a las 96 horas. Ambas subunidades presentaron cinéticas de incorporación al supercomplejo I+III₂ similares a las células control (Figura 32B).

Estos resultados sugieren que no sería necesaria la presencia del complejo IV totalmente ensamblado para la formación del dímero del complejo III ni del supercomplejo I+III₂. Sin embargo, la acumulación de subcomplejos que contiene a las subunidades CORE2 y RISP del complejo III podría ser indicativo de fallos en la biogénesis de dichas estructuras.

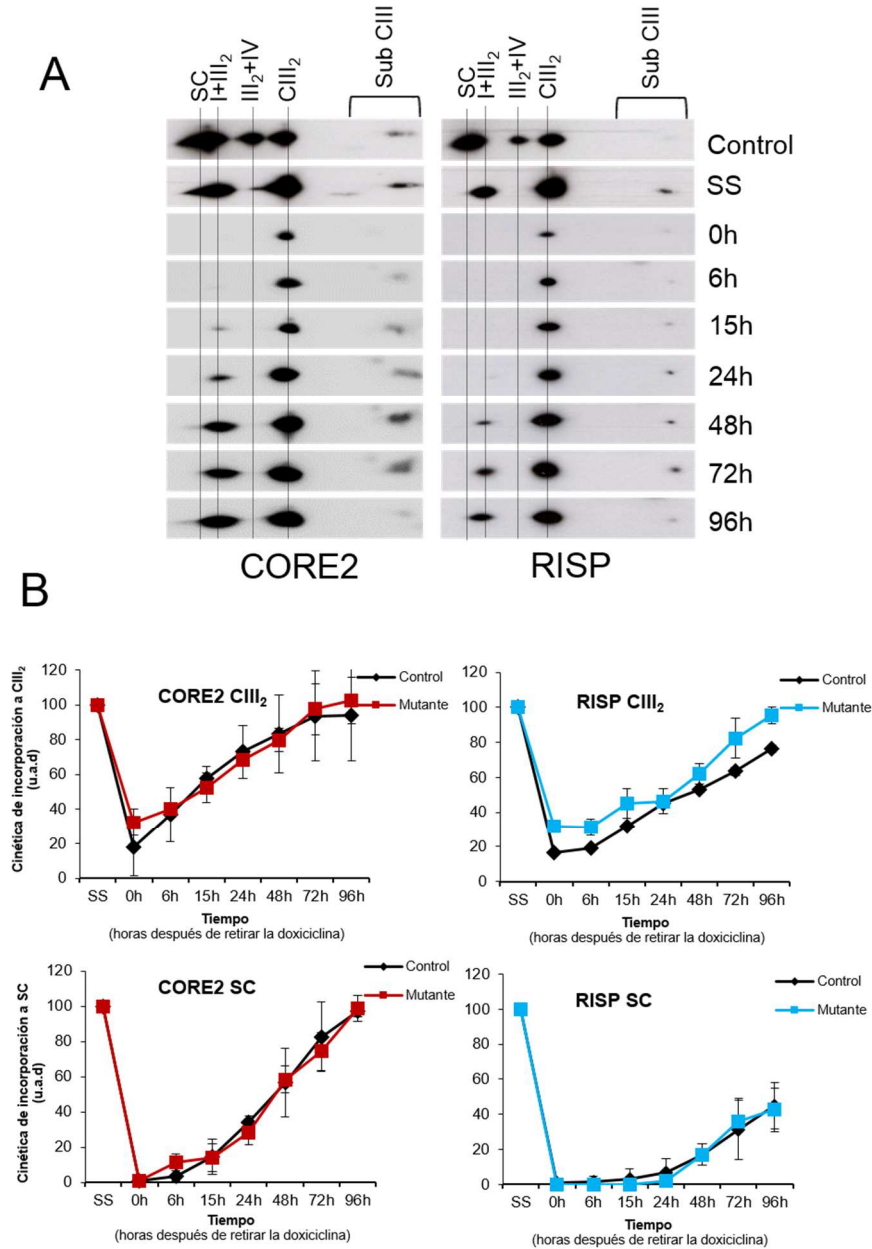


Figura 32. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo III en los supercomplejos de cíbridos mutantes en *MT-CO2*. (A) Los cíbridos mutantes se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxyciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen la subunidades CORE2 y RISP del complejo III. SC, supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n; I+III₂, supercomplejo que contiene a los complejos I y III; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIII₂, dímero del complejo III; Sub CIII, subcomplejo del complejo III. SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en cíbridos mutantes sin tratar con doxyciclina. (B) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blots* de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentajes relativos respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades CORE2 y RISP en células control corresponden a las descritas en la Figura 7C.

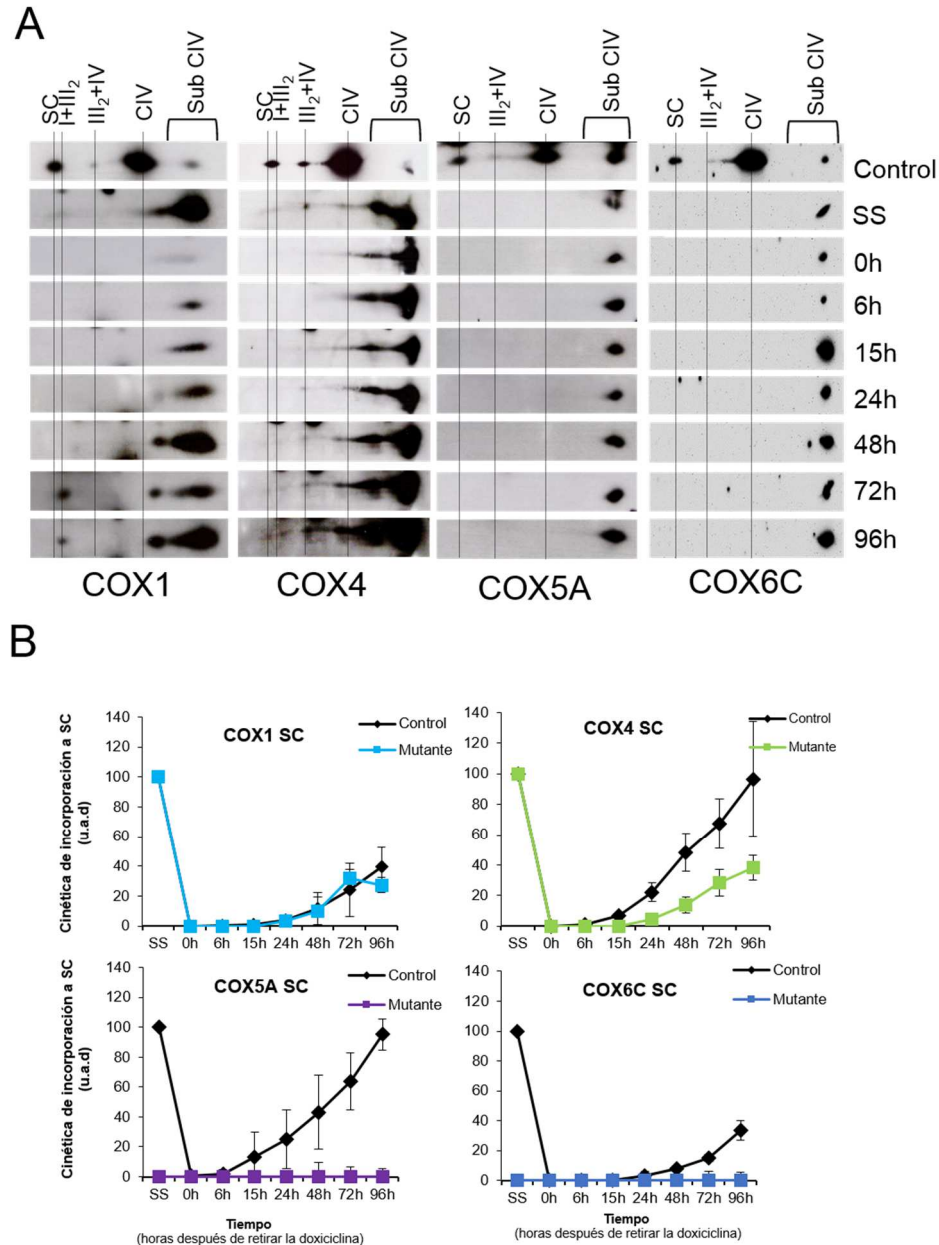


Figura 33. Cinéticas de incorporación de subunidades del complejo IV en el supercomplejo I+III₂ de cíbridos mutantes en *MT-CO2*. (A). Los cíbridos mutantes se crecieron durante 6 días en un medio de cultivo con 15µg/ml de doxyciclina. Tras restaurar la traducción mitocondrial se recogieron las células a las 0, 6, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de retirar el antibiótico. Se analizaron 40µg de proteína mitocondrial en geles de 2D-BN/SDS-PAGE en combinación con *Western-blot*, usando anticuerpos que reconocen la subunidades COX1, COX4, COX5A y COX6C del complejo IV. SC; supercomplejos I+III₂+IV_n; I+III₂, supercomplejo que contiene a los complejos I y III; III₂+IV, supercomplejo que contiene a los complejos III y IV; CIV, complejo IV; Sub-CIV, subcomplejos del complejo IV; SS: niveles estacionarios de los complejos de CRM en cíbridos mutantes sin tratar con doxyciclina. (B) Se cuantificaron las señales obtenidas a partir de los *Western-blot*s de dos experimentos independientes, se normalizaron con respecto a la señal del complejo II y se expresaron como porcentajes relativos respecto a los niveles estacionarios de los supercomplejos en células sin tratar (SS). Los datos representan la media ± desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d). Las cinéticas de las subunidades COX analizadas en células control corresponden a las descritas en la Figura 9B.

2.4.4 Cinéticas de ensamblaje de subunidades del complejo IV en el supercomplejo I+III₂ de cíbridos mutantes en *MT-CO2*

Por último, se analizó la posible incorporación de las subunidades COX1, COX4, COX5A y COX6C en el supercomplejo I+III₂ de los cíbridos mutantes en *MT-CO2* (Figura 33).

Tras 6 días de tratamiento con doxiciclina (0h), no se detectó ninguna señal de subunidades COX en el supercomplejo I+III₂. La subunidad COX1 comenzó a aparecer a niveles bajos a las 48 horas del tratamiento, aumentando gradualmente sus niveles pero sin alcanzar los niveles estacionarios a las 96 horas (Figura 33B). La subunidad COX1 mostró una cinética de incorporación al supercomplejo I+III₂ de las células mutantes similar a su integración en supercomplejo de células control. Por el contrario, la subunidad COX4 presentó un retraso en su cinética de incorporación al supercomplejo I+III₂ con respecto a los controles en cíbridos mutantes en el gen *MT-CO2*. Las subunidades COX5A Y COX6C no se detectaron en ningún momento en el supercomplejo I+III₂ de los cíbridos mutantes en *MT-ND2* (Figuras 33A y 33B).

Estos resultados sugieren que, en ausencia del complejo IV, determinadas subunidades COX, podrían incorporarse de forma secuencial al supercomplejo I+III₂ para formar un supercomplejo I+III₂+IV_n parcialmente ensamblado. Las subunidades COX se incorporaría al supercomplejo I+III₂, el cual actuaría como un intermediario en la formación del supercomplejo I+III₂+IV_n.

2.4.5 Formación del respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en *MT-CO2*.

Con el fin de obtener una visión de conjunto de la ruta de biosíntesis del respirasoma en cíbridos mutantes en *MT-CO2*, se realizó un análisis comparativo de las cinéticas de incorporación al supercomplejo I+III₂ de todas las subunidades de CRM en estudio (Figura 34). Al igual que en controles, en cíbridos mutantes la subunidad NDUFS2 del complejo I se encontrarían inicialmente estabilizada en el intermediario de ensamblaje de ~830 kDa (CI*) del complejo I carente del módulo catalítico N. Este intermediario se desplazaría hacia un intermediario de 1100 kDa y posteriormente hacía el supercomplejo I+III₂ en paralelo a la incorporación de las subunidades NDUFS1 y NDUFV1 del módulo deshidrogenasa del complejo I y de la subunidad CORE2 del complejo. En este mutante, tanto la subunidad CORE2 como las subunidades NDUFS1 y NDUFV1 mostraron cinéticas similares de incorporación al supercomplejo I+III₂, por

lo que no se pudo determinar si la incorporación del módulo N del complejo I ocurre en un paso posterior o en paralelo a la incorporación de CORE2. De nuevo la actividad NADH deshidrogenasa del complejo I se detectó con posterioridad a la incorporación de las subunidades NDUFS1 y NDUFV1, lo que implicaría la existencia de un intermediario de ensamblaje de supercomplejos constituido por el complejo I ensamblado e inactivo y por el complejo III parcialmente ensamblado e inactivo. Posteriormente se unirían la subunidad RISP del complejo III que aunque presenta una cinética de incorporación al supercomplejo I+III₂ similar a las de las subunidades COX1 y COX4 del complejo IV, sus niveles relativos en estado estacionario son mayores. La inserción de la subunidad RISP permitiría la formación del supercomplejo I+III₂ totalmente ensamblado y activo, al que en un último paso se incorporarían las subunidades COX1 y COX4, formando un supercomplejo I+III₂+IV_n parcialmente ensamblado (Figura 34).

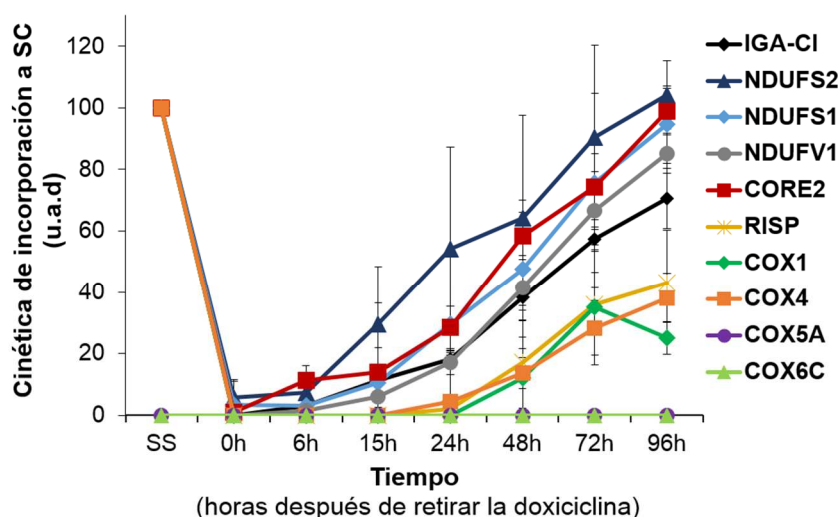


Figura 34. Formación el respirasoma mitocondrial en cíbridos mutantes en *MT-CO2*. Cinéticas de incorporación al supercomplejo I+III₂ obtenidas de cada una de las subunidades de estudio. Los datos representan la media \pm desviación estándar de todas las medidas realizadas. Unidades arbitrarias de densitometría (u.a.d)

DISCUSIÓN

El principal objetivo de la presente tesis ha sido descifrar la ruta de biosíntesis de los supercomplejos mitocondriales, con el fin de entender mejor los mecanismos moleculares que regulan las interdependencias que existen entre los diferentes complejos de la CRM y de explicar los graves defectos de ensamblaje de la CRM que presenta una gran parte de los pacientes con enfermedades mitocondriales.

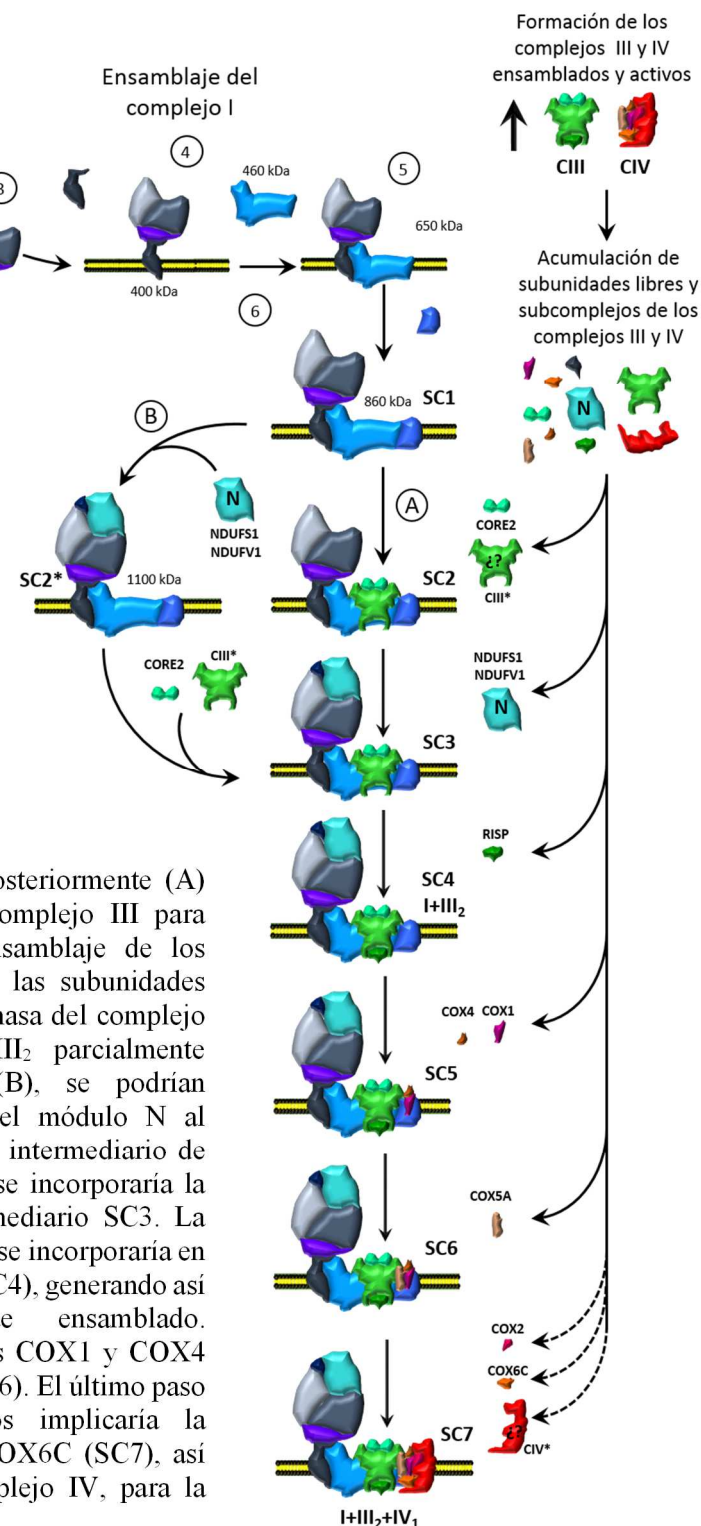
Para abordar el estudio de la dinámica de ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales, en primer lugar se eliminaron los complejos del sistema OXPHOS de líneas celulares control mediante un tratamiento con el antibiótico doxiciclina, que es un inhibidor reversible de la traducción mitocondrial. Tras retirar el del tratamiento, se analizó el ensamblaje de los complejos y supercomplejos de CRM mediante BN-PAGE e inmunodetección. Basándonos en el análisis de las cinéticas de incorporación de distintas subunidades de los complejos I, III y IV del sistema OXPHOS a los supercomplejos, hemos propuesto un primer modelo de ensamblaje secuencial de los supercomplejos mitocondriales (Moreno-Lastres et al, 2012). La novedad conceptual de este modelo radica en que la biogénesis del respirasoma implicaría la asociación coordinada y secuencial de combinaciones específicas de intermediarios parcialmente ensamblados de los complejos de la CRM y de subunidades libres. El estudio en células control sugería que en un primer paso, los complejos III y IV se ensamblarían de forma individual hasta alcanzar sus niveles estacionarios, momento a partir del cual comenzarían a acumularse subunidades libres e intermediarios de ensamblaje de ambos complejos. En este estadio temprano, el ensamblaje del complejo I probablemente también tendría lugar, de acuerdo con resultados previos donde se demuestra que el ensamblaje de los complejos I y III ocurre de forma paralela (Pello et al, 2008). La biogénesis del complejo I procedería hasta el ensamblaje de un intermediario de ~830 kDa, el cual carece del módulo NADH deshidrogenasa y probablemente de otras subunidades (Ugalde et al, 2004; Ogilvie et al, 2005; Lazarou et al, 2007). El patrón de subcomplejos del complejo I observado en este trabajo concuerda con los resultados descritos previamente en modelos celulares humanos (Antonicka et al, 2003; Lazarou et al, 2007; Ugalde et al, 2004; Vogel et al, 2007c). Sin embargo, nuestros datos sugieren que el subcomplejo de ~830 kDa del complejo I constituiría el primer intermediario de ensamblaje de los supercomplejos, ya que permanece como un componente estable para la incorporación posterior de subunidades individuales o subcomplejos de los complejos I, III y IV en al menos cinco pasos secuenciales de ensamblaje. Nuestros datos iniciales en células control sugerían que el último paso del ensamblaje de los supercomplejos

implicaría la asociación de las subunidades catalíticas del módulo NADH deshidrogenasa del complejo I, los que daría lugar a la activación del respirasoma (Moreno-Lastres et al, 2012).

Un análisis posterior realizado en cíbridos transmitocondriales que portan mutaciones en subunidades codificadas por el ADNmt que afectan a la biogénesis de uno de los complejos del sistema OXPHOS, así como la utilización de nuevos anticuerpos que reconocen el módulo NADH deshidrogenasa del complejo I, nos han permitido redefinir de una forma más precisa los pasos intermedios en la biogénesis de los supercomplejos mitocondriales.

En este nuevo modelo (Figuras 34), en un paso inicial las subunidades NDUFA9 y NDUF52 del complejo I colocalizarían en el intermediario de ~830 kDa del complejo I carente del módulo catalítico N, el cual constituiría el primer intermediario de ensamblaje de los supercomplejos (SC1). En segundo lugar existirían dos posibilidades: 1) que la subunidad CORE2 o un subcomplejo del complejo III que contiene a dicha subunidad se uniera al intermediario de ~830 kDa, para formar el segundo intermediario de ensamblaje (SC2), al que posteriormente se incorporarían las subunidades NDUF51 y NDUFV1 del módulo NADH deshidrogenasa del complejo I para formar un supercomplejo I+III₂ parcialmente ensamblado, que constituiría el tercer intermediario de ensamblaje de los supercomplejos (SC3); 2) que las subunidades NDUFV1 y NDUF51 del módulo NADH deshidrogenasa se incorporasen directamente al intermediario de ~830 kDa para formar un intermediario de ~1100 kDa (SC2*), al que se incorporaría la subunidad CORE2 para dar lugar al supercomplejo I+III₂ parcialmente ensamblado (SC3). En una siguiente etapa, se incorporaría la subunidad catalítica RISP del complejo III para formar el supercomplejo I+III₂ completamente ensamblado (SC4). Posteriormente se insertarían en el supercomplejo I+III₂ las subunidades COX, comenzando por las subunidades COX1 y COX4 (SC5), seguida de la subunidad COX5A (SC6) y en un último paso las subunidades COX2 y COX6C así como el resto de subunidades COX (SC7) (Figura 34). Estos resultados sugieren que el intermediario SC1 es la estructura central para la formación del respirasoma y que el supercomplejo I+III₂ podría constituir la unidad estructural mínima donde el complejo I se encuentra totalmente ensamblado y activo. No obstante, debido a la presencia del intermediario de 1100 kDa, compatible con el complejo I totalmente ensamblado y activo, no puede excluirse la posibilidad de que el complejo I se ensamble previamente a su incorporación a los supercomplejos. En los cíbridos mutantes en *MT-CO2*, se

Figura 34. Ensamblaje de los supercomplejos de cadena respiratoria mitocondrial. En un primer paso, tendría lugar la síntesis de los complejos III y IV completamente ensamblados y activos hasta llegar a un umbral que probablemente provoca la acumulación de subunidades libres e intermediarios de ensamblaje de dichos complejos. Simultáneamente, tendría lugar el ensamblaje del complejo I (pasos 1-6), generando el subcomplejo de 830 kDa que constituiría el primer intermediario de ensamblaje de los supercomplejos (SC1). Este subcomplejo permanecería como una estructura estable a la que posteriormente (A) podría unir la subunidad CORE2 del complejo III para formar el segundo intermediario de ensamblaje de los supercomplejos (SC2) y a continuación, las subunidades catalíticas del módulo NADH-deshidrogenasa del complejo I para formar un supercomplejo I+III₂ parcialmente ensamblado (SC3). Alternativamente (B), se podrían incorporar las subunidades catalíticas del módulo N al intermediario de 830 kDa para formar un intermediario de 1100 kDa (SC2*) al que posteriormente se incorporaría la subunidad CORE2 para formar el intermediario SC3. La subunidad catalítica RISP del complejo III se incorporaría en los supercomplejos en un cuarto estadio (SC4), generando así el supercomplejo I+III₂ totalmente ensamblado. Posteriormente se unirían las subunidades COX1 y COX4 (SC5) y después la subunidad COX5A (SC6). El último paso del ensamblaje de los supercomplejos implicaría la asociación de las subunidades COX2 y COX6C (SC7), así como del resto de subunidades del complejo IV, para la formación del respirasoma (I+III₂+IV₁).



observó la acumulación de dicha banda de 1100 kDa con actividad NADH-deshidrogenasa, de un menor peso molecular que los supercomplejos, que contenía a las subunidades NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3 y NDUFV4. La banda de 1100 kDa no se observó ni en los controles ni en los híbridos mutantes en *MT-ND2*, aunque si se detectó al analizar las cinéticas de incorporación de subunidades OXPHOS en el híbrido

mutante en *MT-CYB*. Dado que esta banda presenta un peso molecular algo superior al que cabría esperar para el complejo I individual (980 kDa), es posible que la banda de ~1100 kDa pudiera estar formada por el complejo I total o parcialmente ensamblado además de otras proteínas o factores de ensamblaje. En este sentido, el análisis de mitocondrias de corazón de rata mediante BN-PAGE en geles de poro grande en combinación con espectrometría de masas ha permitido describir el complejo de ensamblaje del complejo I mitocondrial o complejo MCIA (*Mitochondrial complex I assembly*) (Heide et al, 2012; Andrews et al, 1013). Dicho complejo se encontraría formado por la proteína TMEM126, asociada a los factores del ensamblaje del complejo I ACAD9, Ecsit y CIA30 (NDUFAF1). La disminución en los niveles de expresión de la proteína TMEM126B mediante shRNA generó fallos en el ensamblaje del complejo I, así como la disminución de la respiración mitocondrial, indicando que TMEM126B es un componente esencial de la maquinaria de ensamblaje del complejo I. Además los bajos niveles de TMEM126B generaron la acumulación de intermediarios de entre 650-1100 kDa, que contendrían a los factores de ensamblaje ACAD9, Ecsit, CIA30 asociados al complejo I parcialmente ensamblado. La banda de 1100 kDa presente en nuestro estudio presenta actividad en gel del complejo I y al menos estaría formada por las subunidades que conforman el brazo periférico, incluyendo el módulo NADH deshidrogenasa. Además, contendría subunidades que sirven de nexo de unión entre el brazo de membrana y el brazo periférico, como es la subunidad NDUFA9. Dado que no se analizaron subunidades integrales del brazo de membrana, no se puede determinar si el complejo I se encuentra totalmente ensamblado en dicha banda. El análisis de cíbridos transmitocondriales con defectos de ensamblaje en los complejos del sistema OXPHOS ha permitido determinar que dicha banda de 1100 kDa es un intermediario de ensamblaje de los supercomplejos, ya que su formación ocurre en un paso posterior a la formación del intermediario de 830 kDa del complejo I y en un paso previo a la formación de los supercomplejos. Estos resultados descartan por tanto que se trate de un producto de degradación de los supercomplejos. Se requieren análisis adicionales que determinen de una forma más exhaustiva la composición de este intermediario de ~1100 kDa, así como estudios que demuestren el papel funcional que desempeña dicha estructura en la biogénesis de los supercomplejos mitocondriales. Deben existir pasos regulatorios adicionales, ya que se desconoce el significado funcional de las formas intermedias de los supercomplejos I+III₂ o III₂+IV. Dichas estructuras intermedias

podrían ayudar a la síntesis de nuevos supercomplejos como mecanismo de adaptación celular a cambios fisiológicos con diferentes demandas energéticas.

El mecanismo que proponemos por tanto no contradice resultados previos que sugieren que los supercomplejos se generarían a partir de la asociación de los complejos individuales de la CRM completamente ensamblados (Acin-Perez et al, 2008). Para demostrar su hipótesis, los autores analizaron el tiempo de incorporación de las 13 subunidades OXPHOS de codificación mitocondrial, en los complejos y supercomplejos mediante un marcaje radioactivo y BN-PAGE. Dichos resultados mostraron que existe un desfase de tiempo entre la incorporación de las subunidades mitocondriales en los complejos individuales y la formación de los supercomplejos. Nuestros nuevos resultados concuerdan con dicha observación, ya que el análisis adicional de las subunidades OXPHOS codificadas por el ADN nuclear (ADNn) que se proporciona en este trabajo, no excluyen que los supercomplejos se puedan formar a partir de la asociación de los complejos individuales previamente ensamblados. La diferencia fundamental entre ambas aproximaciones radica en que en nuestro trabajo el análisis del ensamblaje de los supercomplejos se realizó a partir de la síntesis *de novo* de los complejos de CRM, mediante la inhibición previa de la traducción mitocondrial, mientras que en el trabajo de Acin-Perez et al, el ensamblaje de los supercomplejos se analizó mediante marcaje metabólico para detectar las subunidades de CRM en los supercomplejos a lo largo del tiempo en células en el estado estacionario. Dicha aproximación produce el solapamiento de dos procesos, por un lado la síntesis *de novo* de los supercomplejos y por otro lado, el recambio de subunidades que pueda generarse en la estructura del respirasoma. La rápida cinética de ensamblaje de los supercomplejos en esas condiciones experimentales es probablemente debida al hecho de que un gran número de subunidades de CRM ya se encuentran previamente ensambladas en subcomplejos que se acumulan como estructuras estables y competentes para la eficiente incorporación de nuevas subunidades OXPHOS en dichos intermediarios de ensamblaje y posteriormente, en los complejos y supercomplejos de CRM (Fernandez-Vizarra et al., 2009). Recientemente, el mismo grupo se ha propuesto un modelo de organización del sistema OXPHOS denominado “modelo de plasticidad”. Dicho modelo propone que los supercomplejos y los complejos libres coexistirían en un equilibrio dinámico como un mecanismo a través del cual las células pueden adaptarse a diferentes fuentes de carbono y reestructurar la CRM en función de los requisitos específicos de cada tipo celular (Lapiente-Brun et al, 2013; Acin-Perez y Enríquez, 2014). Nuestro modelo de

ensamblaje de supercomplejos sugiere que la biogénesis de los complejos III y IV individuales sería previa a la formación completa del complejo I, la cual ocurriría principalmente en el contexto del supercomplejo I+III₂. En este sentido, nuestro modelo apoyaría en principio el modelo de plasticidad, ya que no puede excluir el ensamblaje de los complejos I, III y IV como unidades independientes.

Es importante destacar que nuestro modelo de ensamblaje del respirasoma permite explicar por qué determinados defectos genéticos que afectan a un único complejo mitocondrial generan déficit enzimáticos combinados en pacientes. De hecho, una buena parte de los datos descritos en pacientes y modelos animales con déficit del sistema OXPHOS apoyan los pasos clave del modelo de ensamblaje del respirasoma mitocondrial que se propone en este trabajo. Por ejemplo, se ha descrito la presencia del supercomplejo I+III₂ parcialmente ensamblado en híbridos de ratones carentes de las subunidades ND5 y ND6 del complejo I, a pesar de que presentaron defectos graves de ensamblaje del complejo I (Perales-Clemente et al, 2010). Estos datos sugieren que en ausencia de determinadas subunidades, el complejo I parcialmente ensamblado puede asociarse al complejo III para formar un intermediario del supercomplejo I+III₂. De igual manera, el intermediario de ~830 kDa del complejo I, que contiene la mayoría de las subunidades de complejo I pero no a la subunidad NDUFS4 ni al módulo catalítico N (Lazarou et al., 2007), suele acumularse precisamente en fibroblastos de pacientes con mutaciones en la subunidad NDUFS4 (o en ratones *Knockout* para dicha subunidad), así como en las subunidades del módulo N, como NDUFS1 o NDUFS6 (Calvaruso et al, 2012; Hoefs et al, 2010; Kirby et al, 2004;.. Ugalde et al, 2004). Aún más importante, este intermediario de 830 kDa puede asociarse a las subunidades CORE1 y CORE2 del complejo III para formar supercomplejos parcialmente ensamblados, tanto en células de pacientes con mutaciones en NDUFS4 y NDUFS6, como en los tejidos de ratones mutantes en NDUFS4 (Calvaruso et al, 2012, Lazarou et al 2007). Estos datos apoyarían que no se precisa del complejo I totalmente ensamblado para la formación del respirasoma. Asimismo, en tejidos de pacientes que portaban mutaciones en el gen de *BCS1L*, implicado en el ensamblaje de la subunidad RISP en el complejo III, se observó la acumulación de las proteínas CORE1 y CORE2 en un respirasoma intermedio que carecería de la proteína RISP, lo que sugiere que parte del complejo III podría ensamblarse en un supercomplejo I+III₂ antes de la incorporación de la subunidad RISP (Fernandez-Vizarra et al., 2009). De igual forma, se ha descrito la acumulación de supercomplejos que carecen de la subunidad catalítica RISP tanto en

modelos murinos del síndrome de Gracile, que portan la mutación c.232A>G en el gen *Bcs1l*, como en ratones *knockout* para la subunidad RISP (Díaz et al, 2012; Davoudi et al, 2014). Por otro lado, en mitocondrias de pacientes con fallos en la biogénesis del complejo IV, mostraron una acumulación de las subunidades COX4, COX6A, COX6B, COX6C y COX7A en los supercomplejos en ausencia de complejo IV (Lazarou et al., 2009). Las similitudes existentes entre estos resultados obtenidos en cultivos primarios o tejidos de pacientes y ratones con mutaciones que afectan a la biosíntesis de algunos de los complejos de CRM y las líneas celulares mostradas en nuestro trabajo, apoyarían el mecanismo de ensamblaje del respirasoma en mamíferos que proponemos. Así, existirían preferentemente dos pasos en la biogénesis del sistema OXPHOS: primero, el ensamblaje independiente de los complejos III y IV individuales, y segundo, la asociación de subunidades libres o subcomplejos de los complejos III y IV a los intermediarios de 830 kDa y 1100 kDa del complejo I para la formación el respirasoma, aunque existen amplias discordancias en este punto. Por ejemplo, existen estudios alternativos en modelos celulares de plantas, ratones y en mitocondrias de corazón bovino en los que se ha observado la presencia del complejo I libre y activo además de los supercomplejos (Reifschneider et al, 2006; Gomez et al, 2009; Ramirez-Aguilar et al 2012; Maranzana et al, 2013; Davoudi et al, 20014). Sin embargo, otros estudios realizados en células humanas, concretamente cíbridos transmitocondriales y células de pacientes, solo detectaron al complejo I en la estructura de los supercomplejos (Schagger et al, 2004; D'Aurelio et al, 2006; McKenzie et al, 2006). Dichas discrepancias pueden ser debidas a que la distribución y los niveles de los complejos y supercomplejos varié entre diferentes tejidos o entre especies de eucariotas. En el caso de las mitocondrias de corazón bovino y de ratón, el supercomplejo más abundantes es el I+III₂+IV₁ (Gomez et al, 2009), mientras que en plantas el mayoritario es el I+III₂ (Eubel et al, 2004; Dudkina et al, 2006). Estos datos sugieren así la posibilidad de variaciones en la ruta de biosíntesis de los supercomplejos entre las diferentes especies de eucariotas.

El hecho de que los complejos III y IV puedan ensamblarse bien como holoenzimas individuales, o bien por la unión directa de subunidades o módulos a intermediarios de ensamblaje de los supercomplejos, apoyaría la existencia de rutas de ensamblaje alternativas de estos dos complejos, reguladas de forma independiente. Esto explicaría por qué la disminución en los niveles del complejo I no suelen conducir a defectos funcionales o de ensamblaje de los complejos III y IV en mamíferos (Acin-

Perez et al., 2004; Schagger et al., 2004). Existen algunas excepciones en pacientes con déficit enzimáticos del complejo I debido a mutaciones en la subunidad NDUFS4 (Budde et al, 2000; Ugalde et al, 2004) y en C20ORF7 (Saada et al., 2012) los cuales presentaban déficits enzimáticos combinados del complejo I con los complejos III y IV, respectivamente. Si bien la razón no está clara, existe la posibilidad de que las deficiencias de los complejos III y IV observados en estos pacientes pudieran ser un fenómeno secundario debido a la desestabilización de los supercomplejos.

En relación a la biogénesis del complejo I, se observaron grandes diferencias entre los cíbridos control y los cíbridos mutantes. La mutación en la subunidad ND2 generó un retraso en la incorporación de las subunidades NDUFA9, NDUFS1 y NDUV1 en los intermediarios de los supercomplejos con respecto a los controles. Dicho defecto a su vez dio lugar a un retraso en la incorporación de las subunidades del complejo III y del complejo IV en los supercomplejos. Estos datos sugieren que el complejo I es una pieza fundamental en el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales. Posiblemente, el retraso inicial en la biogénesis del complejo I impida alcanzar los niveles mínimos del intermediario de ~830 kDa necesarios para la correcta incorporación de subunidades de los complejos III y IV en los supercomplejos.

A pesar del retraso observado en los cíbridos mutantes, las cinéticas de ensamblaje en los supercomplejos de las subunidades NDUFS1 y NDUFV1 del módulo N del complejo I fueron similares entre células control y mutantes. Dichas subunidades se incorporaron en supercomplejos en paralelo a la subunidad CORE2 del complejo III en células control y en los cíbridos *MT-ND2* y *MT-CO2*, pero en un paso posterior en el cíbrido *MT-CYB*. Estos resultados sugieren que la incorporación del módulo N del complejo I ocurriría en un paso posterior a la incorporación de la subunidad CORE2 de complejo III. Estudios previos realizados en fibroblastos de pacientes con mutaciones en subunidades en el módulo N han descrito la formación de un supercomplejo I+III₂ parcialmente ensamblado que carece del módulo NADH deshidrogenasa, sugiriendo que dicha estructura podría ser un intermediario de los supercomplejos (Ogilvie et al, 2005; Lazarou et al, 2007; Calvaruso et al, 2012). Un extenso estudio en *Neurospora Crassa* describe que la síntesis y ensamblaje del complejo I estarán estrechamente relacionadas con la formación de los supercomplejos, de manera que la formación del supercomplejo I+III₂ ocurriría antes de que el complejo I se ensamblara en su totalidad (Marques et al, 2007). De igual forma, la incorporación de las subunidades NDUFV1 y NDUFS1 ocurriría en un paso previo a la incorporación de la subunidad catalítica RISP

del complejo III y de las subunidades COX del complejo IV. De acuerdo con dicha hipótesis, en los híbridos mutantes en *MT-CO2*, en ausencia del complejo IV se produce la correcta asociación de los complejos I y III para formar el supercomplejo I+III₂, el cual además presenta actividad NADH-deshidrogenasa. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en mitocondrias de corazón bovino, donde la actividad del complejo III medida espectrofotométricamente era prácticamente nula en el supercomplejo I+III₂ en comparación con el supercomplejo I+III₂+IV_n, sin embargo el complejo I presentaba en el supercomplejo I+III₂ un 50% de la actividad NADH deshidrogenasa dependiente de rotenona observada en el supercomplejo I+III₂+IV_n (Schäfer et al, 2006). De hecho, fallos en la inserción de la subunidad RISP del complejo III pueden conducir a deficiencias secundarias de los complejos I y IV en tejidos humanos (Fernandez-Vizarra et al, 2007; Moran et al, 2010). Estos resultados son consistentes con estudios previos que describen que el complejo I se encontraría mayoritariamente localizado en estructuras de supercomplejos, además de aportar evidencias de que la formación del respirasoma tendría un papel esencial en el ensamblaje y estabilidad del complejo I (Schägger et al, 2004).

Nuestros resultados sugieren además que existe un desfase temporal entre la inserción de las subunidades del módulo N y la actividad de complejo I en los supercomplejos. En estudios previos, se ha propuesto que existía un periodo de tiempo entre la formación del complejo I y la aparición de su actividad (Yadava et al, 2004). Por otro lado, se han descrito dos posibles conformaciones estructurales para el complejo I, una conformación activa (A) y una inactiva (D). La transición de una conformación a otra representaría un mecanismo natural que proporcionaría una respuesta mitocondrial rápida a la privación de oxígeno (Kotlyar et al, 1990; Maklashina et al, 1994; Vinogradov 1998). Posiblemente la acumulación de la forma D del complejo I y por consiguiente, la disminución de la actividad de la cadena respiratoria, podría prevenir la generación de ROS mitocondrial para disminuir así el daño oxidativo producido durante la reoxigenación tras un periodo de isquemia (Herrero, et al 2000; Lambert, et al 2004). Además, el complejo I en su conformación D es incapaz de catalizar la transferencia reversa de electrones, por lo que la forma inactiva podría actuar como una válvula de seguridad, previniendo la reducción de los grupos prostéticos y centros Fe-S del complejo I (Kotlyar, et al 1990). Posiblemente la conformación del complejo I durante la formación de los supercomplejos sea inactiva (D), lo que evitaría el flujo reverso de electrones y la producción de ROS. Una vez que la estructura de los

supercomplejos contuviera todas las subunidades necesarias para la correcta transferencia de electrones a través de la CRM, el complejo I pasaría de su conformación D a la conformación A, confiriéndole su actividad.

En relación a la inserción en los supercomplejos de las subunidades del complejo III tanto en los cíbridos control como en los cíbridos mutantes la subunidad CORE2 se insertaría en los supercomplejos III_2+IV y $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ en un paso previo a la subunidad RISP. Estos datos concuerdan con estudio previos del ensamblaje del complejo III en *S.cerevisiae*, donde se observó que la subunidad CORE2 se estabilizó en un subcomplejo de 500 kDa (pre-complejo III) al cual se incorporaría posteriormente la subunidad RISP (Zara et al, 2007; Zara et al, 2009). La subunidad CORE2 se incorporaría a los supercomplejos en paralelo a las subunidades NDUFA9 y NDUFS2 tanto en cíbridos control como en mutantes. Sin embargo, existen discrepancias en relación a la inserción de CORE2 respecto a la de las subunidades NDUFV1 y NDUFS1 del módulo N del complejo I. En el caso de los cíbridos mutantes en *MT-ND2* y *MT-CO2*, las subunidades del módulo N se insertarían en paralelo a CORE2. Sin embargo, en el cíbrido mutante en *MT-CYB*, su inserción parece ocurrir en un paso posterior a la inserción de la subunidad CORE2. Posiblemente el precomplejo del complejo III, que contiene a la subunidad CORE2 además de otras subunidades, se asociaría bien al intermediario de 830 kDa o bien al de 1100 kDa para formar un supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2$ parcialmente ensamblado, al que en un paso posterior se uniría la subunidad RISP para formar el supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2$ totalmente ensamblado. Es necesaria la realización de experimentos adicionales para poder definir mejor en qué punto del ensamblaje de los supercomplejos se inserta la subunidad CORE2 respecto a las subunidades del módulo NADH deshidrogenasa del complejo I.

Con respecto a la inserción de subunidades o subcomplejos del complejo IV en los supercomplejos, en el cíbrido mutante en *MT-ND2* solo se observó la inserción de las subunidades COX1 y COX5A, aunque sus cinéticas de incorporación a los supercomplejos se encontraban retrasadas con respecto a los controles. En el cíbrido mutante en *MT-CYB* se observó un retraso en la inserción de las subunidades COX4, COX5A y COX6C. Estos resultados sugieren que las mutaciones que afectan al ensamblaje o estabilidad de los complejos I y III y por tanto, a la formación del supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2$, generan retrasos en la incorporación de subunidades del complejo IV a los supercomplejos. Por consiguiente, parece necesaria la correcta formación del supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2$ para la posterior asociación de subunidades o subcomplejos del

complejo IV en los supercomplejos. Estudios de complementación del ADNmt utilizando híbridos mutantes en *MT-CO1* y *MT-CYB* determinaron que el supercomplejo I+III₂ podía formarse en ausencia del complejo IV. Sin embargo, la ausencia de la subunidad citocromo b del complejo III impedía la formación del supercomplejo I+III₂+IV_n (D'Aurelio et al, 2006). Análisis de control de flujo en mitocondrias de mamíferos demostraron que los complejos I y III se comportan cinéticamente como una sola unidad, sugiriendo la existencia de canalización de sustratos entre dichos complejos y por tanto, que el supercomplejo I+III₂ constituye una estructura funcional (Bianchi et al, 2004). Este conjunto de datos sugiere que el supercomplejo I+III₂ actuaría como intermediario en la formación del supercomplejo I+III₂+IV_n, sirviendo como base para la posterior asociación de las subunidades del complejo IV.

Sorprendentemente, el análisis de los supercomplejos mitocondriales en el híbrido mutante en *MT-CO2*, reveló la presencia a muy bajos niveles de las subunidades COX1 y COX4 en los supercomplejos, a pesar de que estas células carecen del complejo IV. Estos resultados sugieren que las subunidades COX1 y COX4 sería la primera subunidad COX en insertarse al supercomplejo I+III₂ y en siguientes pasos, se incorporarían las subunidades COX5A, COX2 y COX6C. Posiblemente, la inserción de las subunidades COX siga los mismos pasos que se han descrito en la ruta de biosíntesis del complejo IV individual (Nijtmans et al 1998; Fornuskova et al, 2010). En un primer paso se uniría las subunidades COX1 y COX4 al supercomplejo I+III₂. Posteriormente se incorporaría las subunidad COX5A, formando un intermediario al que se uniría la subunidad COX2, la cual desencadenaría la rápida unión de la subunidad COX3 y del resto de subunidades supernumerarias del complejo IV para formar el supercomplejo I+III₂+IV_n. Aunque la ausencia del complejo IV no impida la formación del supercomplejo I+III₂, si provoca un acúmulo de subcomplejos del complejo III que contienen a las subunidades CORE2 y RISP, así como de la banda de ~1100 kDa con actividad NADH deshidrogenasa. Algunos investigadores han propuesto que la biogénesis del complejo I individual (Díaz et al, 2006) o su estabilidad en los supercomplejos se podría ver afectada por la ausencia del complejo IV (D'Aurelio et al, 2006; Suthammarak et al, 2009). Asimismo, la inhibición de la expresión de la subunidad COX4 conduce a una disminución de los niveles estacionarios y de la actividad del complejo I en la línea celular A9 (Li et al, 2007). Otros grupos han descrito que la asociación de los complejos I y III no sería suficiente para estabilizar el supercomplejo I+III₂ y que el complejo IV podría actuar como un estabilizador de dicha

estructura (Hornig-Do et al, 2012). Resultados previos de nuestro laboratorio realizados en híbridos control tratados con lauril maltósido, han descrito que la biogénesis del complejo IV individual se produciría en un paso posterior a la de los complejos I y III, y en paralelo a la activación del complejo I y la formación del supercomplejo III₂+IV (Pello et al, 2008). Estos datos sugieren que el complejo IV podría ser un factor limitante en la formación del respirasoma mitocondrial. Posiblemente exista un punto de regulación en la biogénesis del complejo IV que sea dependiente de la correcta formación de los complejos I y III. Además, la mutación c.719C>T en el factor de ensamblaje C20orf7 del complejo I se ha asociado a un déficit combinado de los complejos I y IV (Sugiana et al., 2008). C20orf7 es una metiltransferasa involucrada en la estabilidad o ensamblaje de intermediarios del complejo I en su etapa inicial. Se ha sugerido que C20orf7 desempeña su papel metilando la subunidad NDUF3 del complejo I. Del mismo modo, C20orf7 podría participar en el ensamblaje o estabilidad del complejo IV monomérico mediante la modificación postraduccional de subunidades COX o de otros componentes del sistema OXPHOS importantes para la estabilidad estructural del respirasoma (Sugiana et al., 2008; Saada et al, 2012). En células control y en el híbrido *MT-CYB* la formación del supercomplejo III₂+IV ocurriría en un paso posterior a la formación del respirasoma. Sin embargo en el híbrido mutante en *MT-ND2*, que presentaba un retraso grave en la formación del respirasoma, el supercomplejo III₂+IV parece formarse en un paso previo, indicando así que la formación del supercomplejo III₂+IV sería independiente de la estructura del respirasoma. Estos datos sugieren que en condiciones normales la célula priorizaría la formación del respirasoma frente a la del supercomplejo III₂+IV. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el supercomplejo III₂+IV sea un producto de degradación del supercomplejo I+III₂+IV_n o bien, una estructura estable que se forma de manera independiente al respirasoma, que serviría como base para la formación de nuevos supercomplejos I+III₂+IV_n o de un hipotético supercomplejo II+III₂+IV, a fin de modular la eficiencia del transporte de electrones a través de la CRM.

Nuestros resultados concuerdan con observaciones previas en otros modelos celulares y tejidos de mamíferos, con respecto a la composición y estequiometría de los supercomplejos mitocondriales en las líneas celulares control humanas analizadas. Aproximadamente el 90% del complejo I estaría asociado con el dímero del complejo III y diferentes copias del complejo IV para formar dos especies de supercomplejos mayoritarias; I+III₂ y I+III₂+IV₁₋₄ (Schagger and Pfeiffer, 2001). El ~50-60% del

complejo III y el 70-80% del complejo IV se encontrarían de forma individual, aunque ambos complejos interaccionan de forma dinámica para formar el supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$. Otros estudios, han descrito la presencia de formas alternativas de supercomplejos que, además de los complejos I, III y IV también contendrían al complejo II y a la H^+ -ATP sintasa (complejo V) (Acín-Perez et al, 2008). Una de estas estructuras contendría a todos los complejos de la CRM (complejos I, II, III y IV), además de los transportadores de electrones citocromo c y CoQ y podría consumir oxígeno, lo que reflejaría la correcta disposición de los complejos y transportadores electrónicos en una estructura funcional. Estos hallazgos confirmarían que la organización de la CRM en los supercomplejos es compatible con la transferencia de electrones. Sin embargo, nuestros datos no apoyan la colocación del complejo II en los supercomplejos mitocondriales. Una pequeña cantidad del complejo II comigraría hasta la posición de 400 kDa, por debajo de la posición del complejo III y podría corresponder a un trímero de dicho complejo, tal y como se ha observado en bacterias (Sousa et al., 2011). Asimismo se detectaron cantidades residuales del complejo II en estructuras supramoleculares por encima del supercomplejo $\text{I+III}_2\text{+IV}_n$, que podrían representar al canal mitoK_{ATP} compuesto además del complejo II, de los complejos mABC1, PIC, ANT y la H^+ -ATP sintasa (Ardehali et al, 2004). En ningún caso pudimos detectar la colocación del complejo II con otros complejos de CRM o con los supercomplejos. Estos resultados rebatirían estudios previos basados en análisis de co-inmunoprecipitación y BN-PAGE que describen la unión del complejo II a los supercomplejos (Acin-Perez et al, 2008). Estas discrepancias podrían ser debidas a diferencias técnicas en el método de extracción de las proteínas mitocondriales, a diferencias específicas de tejido e incluso a las condiciones electroforéticas utilizadas. La movilidad electroforética de las muestras puede variar dependiendo de tipo de electroforesis nativa utilizada, pudiendo llegar a observarse patrones diferentes de distribución de una determinada subunidad (Kovárová et al, 2013). Sin embargo, la mayoría de los estudios en los que utilizan técnicas tan diversas como BN-PAGE, microscopia electrónica, crio-electrotomografía, análisis de control de flujo o estudios de colocación de distintas subunidades OXPHOS fluorescentes no mostraron evidencias estructurales o funcionales que apoyen la presencia del complejo II en los supercomplejos de CRM de mamíferos (Dudkina et al, 2011; Lenaz y Genova, 2010; Muster et al, 2010; Quarato et al, 2011; Schäfer et al, 2006; Schagger y Pfeiffer, 2000, 2001). Además, los niveles y la movilidad electroforética de las estructuras de alto peso

molecular que contienen al complejo II no parecen verse afectadas en líneas celulares con déficit aislados de los complejos I, IV y V (Kovárová et al, 2013), al igual que observamos en los híbridos mutantes en *MT-CO2*.

Nuestro modelo podría clarificar indirectamente el papel en el ensamblaje de los supercomplejos de CRM de chaperonas conocidas. El caso más evidente podría ser el del factor de ensamblaje NDUFAF2 (B17.2L), que parece actuar en una etapa tardía del ensamblaje del complejo I. Esta proteína se une al subcomplejo de 830 kDa y participa en la inserción del módulo catalítico N en el complejo I (Vogel et al., 2007b; Ogilvie et al., 2005). Debido a que el subcomplejo de 830 kDa parece ser un intermediario de ensamblaje de los supercomplejos, parece apropiado considerar a NDUFAF2 como el primer factor de ensamblaje del supercomplejo I+III₂. Existe la necesidad de caracterizar funcionalmente la mayor parte de los factores de ensamblaje de los complejos de CRM que se conocen, así como de identificar nuevos factores de ensamblaje que participen en la biosíntesis de los supercomplejos.

Los primeros factores de ensamblaje de supercomplejos descritos fueron las proteínas Rcf1 y Rcf2 en *S.cerevisiae* (Chen et al, 2012; Vukotic et al, 2012; Strogolova et al, 2012). Dichas proteínas median la unión de los complejos III y IV para la formación de los supercomplejos III₂+IV₁ y III₂+IV₂. La pérdida de Rcf1 afecta a la función del complejo IV, promueve la generación de especies reactivas del oxígeno y causa fallos en la función respiratoria como consecuencia de la desestabilización de los supercomplejos. De igual forma la ausencia de HIG2A, el homólogo de Rcf1 en mamíferos, provoca defectos en la formación de los supercomplejos que contiene al complejo IV en mioblastos C2C12 (Chen et al, 2012). Dicho factor pertenece a una familia de proteínas cuya expresión se induce en condiciones de hipoxia. Posiblemente, en el contexto de nuestro modelo, HIG2A podría estar mediando la unión del complejo IV al supercomplejo I+III₂ modulando el número de copias del complejo IV que contiene el respirasoma en función de los niveles de oxígeno.

Recientemente, se ha identificado en fibroblastos de ratón un nuevo factor de ensamblaje de supercomplejos: COX7A2L/COX7RP/SCAFI (Lapiente-Brun et al, 2013; Ikeda et al, 2013). Dicha proteína parece mediar la interacción entre los complejos III y IV en los supercomplejos III₂+IV y I+III₂+IV_n. Se ha propuesto que COX7A2L podría definir distintas poblaciones de complejo IV que, de acuerdo con sus estados de ensamblaje (complejo IV libre o asociado a los supercomplejos), permitiría minimizar la inhibición competitiva de la respiración entre los complejos I y II de la CRM

(Lapiente-Brun et al, 2013). Sin embargo, este modelo asume que los supercomplejos que contienen al complejo IV también contienen al citocromo c funcional, un tema controvertido que aún debe ser demostrado convincentemente (Acín-Pérez et al, 2008; Althoff et al, 2011). Por otro lado, la eliminación de COX7A2L y por consiguiente la ausencia de complejo IV en los supercomplejos, no parece afectar a la función respiratoria mitocondrial, lo que sugeriría que no es necesario el respirasoma para la correcta función de la CRM (Lapiente-Brun et al. 2013). Sin embargo, estudios alternativos realizados en ratones *Knockout* para COX7A2L, proponen que COX7A2L mediaría el ensamblaje del respirasoma para obtener la total actividad de la CRM en el músculo esquelético (Ikeda et al., 2013). Además, la ausencia de COX7A2L generaba una disminución del ATP y del consumo de oxígeno en presencia de diferentes sustratos de CRM, sugiriendo que es necesario la estructura del respirasoma para la correcta función respiratoria (Ikeda et al., 2013).

En el modelo que presentamos es posible que, una vez completado el ensamblaje del respirasoma, COX7A2L pudiera participar en el intercambio dinámico entre el supercomplejo I+III₂+IV y el complejo IV, modulando la estequiometría variable del complejo IV dentro de los supercomplejos. La ausencia de COX7A2L provoca la ausencia de los supercomplejos que contienen al complejo IV, incluyendo al respirasoma (Lapiente-Brun et al., 2013, Ikeda et al., 2013). Curiosamente, la falta de respirasomas en cepas control de ratones no conducía a fenotipos patológicos evidentes, lo que sugiere firmemente que los respirasomas podrían no ser las formas funcionales preferentes de la CRM (Lapiente-Brun et al., 2013). Consistentemente, el análisis metabólico del control de flujo propone la disposición de los complejos I y III en un supercomplejo funcional, en el que la CoQ estaría en un equilibrio de disociación entre unida a los supercomplejos o difundiendo libremente, mientras que el complejo IV actuaría principalmente en su forma libre (Genova y Lenaz, 2013).

Se requiere trabajo adicional para explicar en detalle el ensamblaje de todas las subunidades OXPHOS en el respirasoma, e identificar los mecanismos que regulan las diversas rutas de biogénesis para la formación de los complejos y supercomplejos de CRM y su modulación en respuesta a las condiciones ambientales y fisiológicas. Nuestro modelo de ensamblaje del respirasoma mitocondrial proporciona un punto de partida para el estudio de este intrincado proceso, y proporciona un marco para comprender mejor los defectos de ensamblaje de CRM en pacientes con enfermedades mitocondriales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las líneas celulares 143B206, HEK293 y cíbrido control no presentan diferencias significativas en la distribución relativa de subunidades de cadena respiratoria mitocondrial entre los complejos y supercomplejos mitocondriales. El ~90% del complejo I se encuentra en forma de supercomplejos I+III₂ y I+III₂+IV_n o respirasoma, mientras que únicamente el 50% y 20% de los complejos III y IV, respectivamente, se encuentran en estas dos formas de supercomplejos.
2. El complejo II no forma parte del supercomplejo I+III₂+IV_n, y aunque se detecta en estructuras de alto peso molecular éstas no colocalizan con los supercomplejos.
3. El tratamiento de 6 días con 15µg/ml de doxiciclina inhibe la traducción mitocondrial en células 143B206 sin afectar a la traducción citoplasmática. Este tratamiento produce una reducción reversible del número de copias de ADNmt asociada a una reducción de los niveles de complejos individuales y supercomplejos de CRM.
4. La formación del respirasoma, supercomplejo I+III₂+IV_n, se origina a partir del intermediario de 830 kDa del complejo I, al cual se incorporan subcomplejos o subunidades libres del complejo III y del módulo NADH deshidrogenasa del complejo I para formar el supercomplejo I+III₂ totalmente ensamblado y activo. A este supercomplejo I+III₂ se incorporan secuencialmente las subunidades COX del complejo IV para formar el respirasoma mitocondrial.
5. El respirasoma mitocondrial se origina a partir de la asociación de subunidades libres y de subcomplejos de CRM, y no de los complejos de la CRM previamente ensamblados.
6. La activación del complejo I en los supercomplejos ocurre con posterioridad a la inserción de las subunidades del módulo NADH deshidrogenasa.

7. La mutación m.4681T>C en el gen que codifica la subunidad ND2 del complejo I produce un retraso en la formación del intermediario de ensamblaje de ~830 kDa del complejo I y de los supercomplejos III_2+IV y $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ sin afectar a la formación de los complejos III y IV.
8. En células humanas la formación del supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ ocurre de forma preferente respecto a la formación del supercomplejo III_2+IV . Las alteraciones en la biosíntesis del supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ debidas a la mutación m.4681T>C en la subunidad ND2 del complejo I favorecen la síntesis del supercomplejo III_2+IV , indicando que ambas superestructuras se forman mediante procesos independientes.
9. La mutación m.15533A>G en la subunidad citocromo b del complejo III produce un retraso en la formación de los supercomplejos III_2+IV y $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ sin afectar a la biosíntesis de los complejos III y IV libres.
10. La ausencia del complejo IV debido a la mutación m.7896G>A en la subunidad COX2, no impide la formación del supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2$ totalmente ensamblado y activo. Las subunidades COX1 y COX4 del complejo IV pueden asociarse a dicha estructura formando un supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2+\text{IV}_n$ parcialmente ensamblado.

BIBLIOGRAFÍA

Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., and Enriquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13, 805-815.

Acin-Perez, R., P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos and J. A. Enriquez. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*. 32(4): 529-539.

Acin-Perez R, Enriquez JA. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta*. 1837(4):444-50.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Biología molecular de la célula*. 5ª ed. Omega; (2010).

Althoff T, Mills DJ, Popot JL, Kühlbrandt W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I₁III₂IV₁. *EMBO J*. Sep 9;30 (22):4652-64.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290, 457-465.

Andreu, A.L., Martinez, R., Marti, R., and Garcia-Arumi, E. (2009). Quantification of mitochondrial DNA copy number: preanalytical factors. *Mitochondrion*. 9, 242-246.

Andrews B, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. (2013). Assembly factors for the membrane arm of human complex I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(47):18934-9.

Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., and Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 23, 147.

Antonicka, H., Ogilvie, I., Taivassalo, T., Anitori, R.P., Haller, R.G., Vissing, J., Kennaway, N.G., and Shoubridge, E.A. (2003). Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem*. 278, 43081-43088.

- Ardehali, H., Chen, Z., Ko, Y., Mejia-Alvarez, R., and Marban, E. (2004). Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11880–11885.
- Arnarez C, Marrink SJ, Periole X. (2013a). Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels. *Sci Rep*. 3:1263.
- Arnarez C, Mazat JP, Elezgaray J, Marrink SJ, Periole X. (2013b). Evidence for cardiolipin binding sites on the membrane-exposed surface of the cytochrome bc1. *J Am Chem Soc*. 27;135 (8):3112-20.
- Arnold, S., and Kadenbach, B. (1997). Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem*. 249, 350-354.
- Atkinson, A., Smith, P., Fox, J.L., Cui, T.Z., Khalimonchuk, O., and Winge, D.R. (2011). The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol*. 31, 3988-3996.
- Attardi, G. and G. Schatz. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*. 4: 289-333.
- Babot M, Birch A, Labarbuta P, Galkin A. (2014). Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. Feb 22.
- Bai, Y., and Attardi, G. (1998). The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *EMBO J*. 17, 4848-4858.
- Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004). Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 23, 3472-3482.
- Bayona-Bafaluy MP, Müller S, Moraes CT. (2005). Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. *Mol Biol Evol*. 22(3):716-24.
- Bazán S, Mileyskoykaya E, Mallampalli VK, Heacock P, Sparagna GC, Dowhan W. (2013). Cardiolipin-dependent reconstitution of respiratory supercomplexes from purified *Saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV. *J Biol Chem*. 4;288 (1):401-11.

- Berden, J.A., Nieboer, P., and Hartog, A.F. (1988). Dissociation-reconstitution experiments with NBD-modified F1: support for the presence of two catalytic beta-subunits. *Prog Clin Biol Res.* 273, 81-86.
- Berry, E.A., and Trumpower, B.L. (1985). Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes. *J Biol Chem.* 260, 2458-2467.
- Bianchi C, Genova ML, Parenti Castelli G, Lenaz G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem.* 279(35):36562-9.
- Birchmeier W, Kohler CE, Schatz G. (1976). Interaction of integral and peripheral membrane proteins: affinity labeling of yeast cytochrome oxidase by modified yeast cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73 (12):4334-8.
- Boekema, E. J. and H. P. Braun. (2007). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem.* 282(1): 1-4.
- Boumans, H., Grivell, L.A., and Berden, J.A. (1998). The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem.* 273, 4872-4877.
- Bourges, I., Ramus, C., Mousson de Camaret, B., Beugnot, R., Remacle, C., Cardol, P., Hofhaus, G., and Issartel, J.P. (2004). Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochem J.* 383, 491-499.
- Brown MD, Allen JC, Van Stavern GP, Newman NJ, Wallace DC. (2001). Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *Am J Med Genet.* 15;104 (4):331-8.
- Bruel, C., Brasseur, R., and Trumpower, B.L. (1996). Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J Bioenerg Biomembr.* 28, 59-68.

- Bruno, C., Martinuzzi, A., Tang, Y., Andreu, A.L., Pallotti, F., Bonilla, E., Shanske, S., Fu, J., Sue, C.M., Angelini, C. (1999). A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV. *Am J Hum Genet.* 65, 611-620.
- Brys, K., Castelein, N., Matthijssens, F., Vanfleteren, J.R., y Braeckman, B.P. (2010). Disruption of insulin signalling preserves bioenergetic competence of mitochondria in ageing *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol.* 8, 91.
- Budde SM, van den Heuvel LP, Janssen AJ, Smeets RJ, Buskens CA, DeMeirleir L, Van Coster R, Baethmann M, Voit T, Trijbels JM, Smeitink JA. (2000). Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;275 (1):63-8.
- Bultema, J. B., H. P. Braun, E. J. Boekema and R. Kouril (2009). Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim Biophys Acta.* 1787(1): 60-67.
- Calvaruso MA, Willems P, van den Brand M, Valsecchi F, Kruse S, Palmiter R, Smeitink J, Nijtmans L. (2012). Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUFS4 to provide partial activity. *Hum Mol Genet.* 1;21 (1):115-20.
- Campos Y, García-Redondo A, Fernández-Moreno MA, Martínez-Pardo M, Goda G, Rubio JC, Martín MA, del Hoyo P, Cabello A, Bornstein B, Garesse R, Arenas J. (2001). Early-onset multisystem mitochondrial disorder caused by a nonsense mutation in the mitochondrial DNA cytochrome C oxidase II gene. *Ann Neurol.* 50(3):409-13.
- Castellani M, Covian R, Kleinschroth T, Anderka O, Ludwig B, Trumpower BL. (2010). Direct demonstration of half-of-the-sites reactivity in the dimeric cytochrome bc1 complex: enzyme with one inactive monomer is fully active but unable to activate the second ubiquinol oxidation site in response to ligand binding at the ubiquinone reduction site. *J Biol Chem.* 1;285 (1):502-10.
- Chalmers, R.M., Brockington, M., Howard, R.S., Lecky, B.R., Morgan-Hughes, J.A., and Harding, A.E. (1996). Mitochondrial encephalopathy with multiple mitochondrial DNA deletions: a report of two families and two sporadic cases with unusual clinical and neuropathological features. *Journal of the neurological sciences.* 143, 41-45.

- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature*. 176, 250-254.
- Chen YC, Taylor EB, Dephoure N, Heo JM, Tonhato A, Papandreou I, Nath N, Denko NC, Gygi SP, Rutter J. (2012). Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab*. 7;15 (3):348-60.
- Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. (1994). Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet*. 54(6):966-74.
- Clason, T., Ruiz, T., Schagger, H., Peng, G., Zickermann, V., Brandt, U., Michel, H., and Radermacher, M. (2010). The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J. Struct Biol*. 169, 81-88.
- Clayton, D. A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 28(4): 693-705.
- Clayton, D. A. (1991). Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol*. 7: 453-478.
- Colindres M, Fournier C, Ritter S, Zahnreich S, Decker H, Dencher N, Frenzel M (2007) Increase of oxidative stress in normal human fibroblasts after irradiation. *GSI Sci Rep*. 356.
- Crivellone, M.D., Wu, M.A., and Tzagoloff, A. (1988). Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase complex. *J Biol Chem*. 263, 14323-14333.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R.A. (2000). The cytochrome bc₁ and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 275, 18093-18098.
- Cui, T.Z., Smith, P.M., Fox, J.L., Khalimonchuk, O., and Winge, D.R. (2012). Late stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the AAA ATPase Bcs1. *Mol Cell Biol*. 32, 4400-4409.

Cui TZ, Conte A, Fox JL, Zara V, Winge DR. (2014). Modulation of the respiratory supercomplexes in yeast: enhanced formation of cytochrome oxidase increases the stability and abundance of respiratory supercomplexes. *J Biol Chem.* Feb 28;289(9):6133-41.

D'Aurelio, M., Pallotti, F., Barrientos, A., Gajewski, C.D., Kwong, J.Q., Bruno, C., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2001). In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I. *J Biol Chem.* 276, 46925-46932.

D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lin, M.T., Mauck, W.M., Shao, L.Z., Lenaz, G., Moraes, C.T., and Manfredi, G. (2004). Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Human molecular genetics.* 13, 3171- 3179.

D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lenaz, G., and Manfredi, G. (2006). Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet.* 15, 2157-2169.

Dani, D., Shimokawa, I., Komatsu, T., Higami, Y., Warnken, U., Schokraie, E., Schnolzer, M., Krause, F., Sugawa, M.D., and Dencher, N.A. (2010). Modulation of oxidative phosphorylation machinery signifies a prime mode of anti-ageing mechanism of calorie restriction in male rat liver mitochondria. *Biogerontology.* 11, 321-334.

Darley-USmar VM, Georgevich G, Capaldi RA. (1984). Reaction of thionitrobenzoate-modified yeast cytochrome c with monomeric and dimeric forms of beef heart cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* Jan 23;16 6(1):131-5.

Davoudi M, Kallijärvi J, Marjavaara S, Kotarsky H, Hansson E, Levéen P, Fellman V. (2014). A mouse model of mitochondrial complex III dysfunction induced by myxothiazol. *Biochem Biophys Res Commun.* 21. pii: S0006-291X(14)00501-4.

De Haan, M., van Loon, A.P., Kreike, J., Vaessen, R.T., and Grivell, L.A. (1984). The biosynthesis of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex in yeast. DNA sequence analysis of the nuclear gene coding for the 14-kDa subunit. *Eur J Biochem.* 138, 169-177.

Dencher, N.A., Frenzel, M., Reifschneider, N.H., Sugawa, M., and Krause, F. (2007). Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1100, 291-298.

Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes CT. (2006). Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 26(13):4872-81.

Diaz F, Enríquez JA, Moraes CT. (2012). Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV. *Mol Cell Biol.* 32(2):415-29.

Dibrov E, Fu S, Lemire BD. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II). *J Biol Chem.* 273:32042.

Dieteren, C.E., Willems, P.H., Vogel, R.O., Swarts, H.G., Fransen, J., Roepman, R., Crienien, G., Smeitink, J.A., Nijtmans, L.G., and Koopman, W.J. (2008). Subunits of mitochondrial complex I exist as part of matrix- and membrane-associated subcomplexes in living cells. *J Biol Chem.* 283, 34753-34761.

DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Servidei S, DeVivo DC, Schon EA. (1987). Mitochondrial myopathies. *J Inherit Metab Dis.* 10 Suppl 1:113-28.

DiMauro S y Hirano M. (1993). MELAS.

Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, M., Lindahl, M., Schagger, H., and Brandt, U. (2000). Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1459, 230-238.

Dunning, C.J., McKenzie, M., Sugiana, C., Lazarou, M., Silke, J., Connelly, A., Fletcher, J.M., Kirby, D.M., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2007). Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. *EMBO J.* 26, 3227-3237.

Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., and Braun, H.P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 3225-3229.

Dudkina N.V, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP. (2006). Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci.* 211(5):232-40.

Dudkina, N. V., M. Kudryashev, H. Stahlberg and E. J. Boekema (2011). Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(37): 15196-15200.

Dunbar, D.R., Moonie, P.A., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (1995). Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 92, 6562-6566.

Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., and Braun, H.P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem.* 42, 937-942.

Fernandez-Vizarra, E., Bugiani, M., Goffrini, P., Carrara, F., Farina, L., Procopio, E., Donati, A., Uziel, G., Ferrero, I., and Zeviani, M. (2007). Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet.* 16, 1241-1252.

Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2009). Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 200-211.

Finley LW, Haas W, Desquirit-Dumas V, Wallace DC, Procaccio V, Gygi SP, Haigis MC. (2011). Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS One.* 6(8):e23295.

Fontanesi, F., Clemente, P., and Barrientos, A. (2011). Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 expression and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 286, 555-566.

Fontanesi, F., Soto, I.C., and Barrientos, A. (2008). Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life.* 60, 557-568.

Fontanesi, F., Soto, I.C., Horn, D., and Barrientos, A. (2010). Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis. *Mol Cell Biol* 30, 245-259.

- Fowler, L.R., and Richardson, S.H. (1963). Studies on the electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system. *J Biol Chem.* 238, 456-463.
- Fornuskova, D., Stiburek, L., Wenchich, L., Vinsova, K., Hansikova, H., and Zeman, J. (2010). Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b. *Biochem. J.* 428, 363–374.
- Fowler, L. R. and S. H. Richardson (1963). Studies on the electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system. *J Biol Chem.* 238: 456-463.
- García Montes de Oca LY, Chagolla-López A, González de la Vara L, Cabellos-Avelar T, Gómez-Lojero C, Gutiérrez Cirlos EB. (2012). The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes. *J Bioenerg Biomembr.* 44(4):473-86.
- Genova ML, Lenaz G. (2013). A critical appraisal of the role of respiratory supercomplexes in mitochondria. *Biol Chem.* 2013 May;394(5):631-9.
- Gershoni, M., Fuchs, A., Shani, N., Fridman, Y., Corral-Debrinski, M., Aharoni, A., Frishman, D., and Mishmar, D. (2010). Coevolution predicts direct interactions between mtDNA-encoded and nDNA-encoded subunits of oxidative phosphorylation complex i. *J Mol Biol.* 404, 158-171.
- Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G et al (2009) SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat Genet.* 41:654–656.
- Gil Borlado, M.C., Moreno Lastres, D., Gonzalez Hoyuela, M., Moran, M., Blazquez, A., Pello, R., Marin Buera, L., Gabaldon, T., Garcia Penas, J.J., Martin, M.A., (2010). Impact of the mitochondrial genetic background in complex III deficiency. *PLoS One.* 17;5(9).
- Giles, R. E., H. Blanc, H. M. Cann and D. C. Wallace. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(11): 6715-6719.
- Gohil VM, Hayes P, Matsuyama S, Schägger H, Schlame M, Greenberg ML. (2004). Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent. *J Biol Chem.* 8;279 (41):42612-8.

- Gomez, L.A., Monette, J.S., Chavez, J.D., Maier, C.S., and Hagen, T.M. (2009). Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Arch Biochem Biophys.* 490, 30-35.
- Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Montoya J. (2010). Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet.* 19: 3343–3353.
- Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero I, López-Gallardo E, López-Pérez MJ, Montoya J, Ruiz-Pesini E. (2012). Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta.* 1822(8):1216-22.
- Gómez LA, Hagen TM. (2012). Age-related decline in mitochondrial bioenergetics: does supercomplex destabilization determine lower oxidative capacity and higher superoxide production? *Semin Cell Dev Biol.* 23(7):758-67.
- Gonzalvez F, D'Aurelio M, Boutant M, Moustapha A, Puech JP, Landes T, Arnauné-Pelloquin L, Vial G, Taleux N, Slomianny C, Wanders RJ, Houtkooper RH, Bellenguer P, Møller IM, Gottlieb E, Vaz FM, Manfredi G, Petit PX. (2013). Barth syndrome: cellular compensation of mitochondrial dysfunction and apoptosis inhibition due to changes in cardiolipin remodeling linked to tafazzin (TAZ) gene mutation. *Biochim Biophys Acta.* 1832(8):1194-206.
- Grad LI, Lemire BD. (2004). Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis. *Hum Mol Genet.* 1;13(3):303-14.
- Grad LI, Lemire BD. (2006). Riboflavin enhances the assembly of mitochondrial cytochrome c oxidase in *C. elegans* NADH-ubiquinone oxidoreductase mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1757(2):115-22.
- Green, D.E., and Tzagoloff, A. (1966). The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys.* 116, 293-304.
- Grigorieff, N. (1998). Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol.* 277, 1033-1046.

Grivell, L.A. (1989). Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur J Biochem.* 182, 477-493.

Gruschke, S., Kehrein, K., Rompler, K., Grone, K., Israel, L., Imhof, A., Herrmann, J.M., and Ott, M. (2011). Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome b synthesis and assembly. *J Cell Biol.* 193, 1101-1114.

Guarani V, Paulo J, Zhai B, Huttlin EL, Gygi SP, Harper JW. TIMMDC1/C3orf1 functions as a membrane-embedded mitochondrial complex I assembly factor through association with the MCIA complex. (2014). *Mol Cell Biol.* 34 (5):847-61.

Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., and Friedrich, T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol.* 276, 105-112.

Hackenbrock CR, Chau RM, Hammon K, Höchli L. (1979). Localization of enzymes in mitochondrial membranes with ferritin conjugates of affinity purified antibodies. *Methods Enzymol.* 56:683-717.

Hackenbrock, C. R., B. Chazotte and S. S. Gupte. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr.* 18(5): 331-368.

Hall, R.E., and Hare, J.F. (1990). Respiratory chain-linked NADH dehydrogenase. Mechanisms of assembly. *J Biol Chem.* 265, 16484-16490.

Hamanaka RB, Chandel NS. (2013). Mitochondrial metabolism as a regulator of keratinocyte differentiation. *Cell Logist.* 1;3(1):e25456.

Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephoure N, Bayley JP, Kunst H, Devilee P, Cremers CW, Schiffman JD, Bentz BG, Gygi SP, Winge DR, Kremer H, Rutter J. (2009) SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science.* 328:1139–1142.

Hatefi, Y.a.R., J.S (1967). the preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (complex I-III of the respiratory chain). *Methods Enzymol.* 10, 225-231.

- Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I. (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;88 (23):10614-8.
- Heide, H., Bleier, L., Steger, M., Ackermann, J., Droese, S., Schwamb, B., Zornig, M., Reichert, A.S., Koch I, Wittig I, Brandt U. (2012). Complexome Profiling Identifies TMEM126B as a Component of the Mitochondrial Complex I Assembly Complex. *Cell metabolism* 16, 538-549.
- Heinemeyer, J., H. P. Braun, E. J. Boekema y R. Kouril. (2007). A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 282(16): 12240-12248.
- Helling, S., Vogt, S., Rhiel, A., Ramzan, R., Wen, L., Marcus, K., y Kadenbach, B. (2008). Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase. *Mol Cell Proteomics.* 7, 1714-1724.
- Herrmann JM, Neupert W. Protein transport into mitochondria. (2000). *Curr Opin Microbiol.* 3(2):210-4.
- Heron, C., Ragan, C.I., and Trumpower, B.L. (1978). The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Restoration of ubiquinone-pool behaviour. *Biochem J* 174, 791-800.
- Herrero A, Barja G. (2000). Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 32(6):609-15.
- Hinchliffe, P. y Sazanov, L.A. (2005). Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science.* 309, 771-774.
- Hirst, J. (2003). The dichotomy of complex I: a sodium ion pump or a proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 773-775.
- Hochman, J., Ferguson-Miller, S., and Schindler, M. (1985). Mobility in the mitochondrial electron transport chain. *Biochemistry.* 24, 2509-2516.

- Hoefs, S.J., Skjeldal, O.H., Rodenburg, R.J., Nedregaard, B., van Kaauwen, E.P., Spiekerkotter, U., von Kleist-Retzow, J.C., Smeitink, J.A., Nijtmans, L.G., and van den Heuvel, L.P. (2010). Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Mol. Genet. Metab.* 100, 251–256.
- Hoefs SJ, Rodenburg RJ, Smeitink JA, van den Heuvel LP. (2012). Molecular base of biochemical complex I deficiency. *Mitochondrion*. 12(5):520-32.
- Hofhaus, G. y Attardi, G. (1993). Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product. *EMBO J.* 12, 3043-3048.
- Hofhaus, G. y Attardi, G. (1995). Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Mol Cell Biol.* 15, 964-974.
- Hofhaus, G., Weiss, H. y Leonard, K. (1991). Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J Mol Biol.* 221, 1027-1043.
- Horvat, S., Beyer, C. y Arnold, S. (2006). Effect of hypoxia on the transcription pattern of subunit isoforms and the kinetics of cytochrome c oxidase in cortical astrocytes and cerebellar neurons. *J Neurochem.* 99, 937-951.
- Hosler JP. (2004). The influence of subunit III of cytochrome c oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I. *Biochim Biophys Acta.* 12; 1655(1-3):332-9.
- Hosler JP, Ferguson-Miller S, Mills DA. (2006). Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:165-87.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmannith, T., y Michel, H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure.* 8, 669-684.
- Huttemann, M., Kadenbach, B., y Grossman, L.I. (2001). Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene* 267, 111-123.

Huttemann, M., Lee, I., Pecinova, A., Pecina, P., Przyklenk, K., y Doan, J.W. (2008). Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 40, 445-456.

Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. (2013). A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun.* 2013;4:2147.

Iwasaki, T., Matsuura, K., and Oshima, T. (1995). Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *J Biol Chem.* 270, 30881-30892.

Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., and Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science.* 281, 64-71.

Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47:53-67.

Kadenbach, B., Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I., and Bender, E. (2000). Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med.* 29, 211-221.

Kasamatsu, H. and J. Vinograd (1974). Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 43(0): 695-719.

King, M.P., and Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 246, 500-503.

King, M.P., and Attardi, G. (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods in enzymology.* 264, 304-313.

Kirby, D.M., Salemi, R., Sugiana, C., Ohtake, A., Parry, L., Bell, K.M., Kirk, E.P., Boneh, A., Taylor, R.W., Dahl, H.H., et al. (2004). NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *J. Clin. Invest.* 114, 837-845.

- Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal*. 15;12(12):1431-70.
- Kotarsky H, Keller M, Davoudi M, Levéen P, Karikoski R, Enot DP, Fellman V. (2012). Metabolite profiles reveal energy failure and impaired beta-oxidation in liver of mice with complex III deficiency due to a BCS1L mutation. *PLoS One*. 7(7):e41156.
- Kotlyar AB, Vinogradov AD. (1990). Slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim Biophys Acta*. 1019(2):151-8.
- Kovarova N, Cížková Vrbacká A, Pecina P, Stránecký V, Pronicka E, Kmoch S, Houštěk J. (2012). Adaptation of respiratory chain biogenesis to cytochrome c oxidase deficiency caused by SURF1 gene mutations. *Biochim Biophys Acta*. 1822(7):1114-24.
- Kovarova J, Bajzikova M, Vondrusova M, Stursa J, Goodwin J, Nguyen M, Zabalova R, Pesdar EA, Truksa J, Tomasetti M, Dong LF, Neuzil J. (2014). Mitochondrial targeting of α -tocopheryl succinate enhances its anti-mesothelioma efficacy. *Redox Rep*. 19 (1):16-25.
- Krause, F. (2006). Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*. 27, 2759-2781.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S., and Dencher, N.A. (2005). Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 329, 583-590.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S., and Dencher, N.A. (2004). Respirasome-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J Biol Chem*. 279, 48369-48375.
- Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A., and Osiewacz, H.D. (2006). OXPHOS Supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospora anserina*. *Ann N Y Acad Sci*. 1067, 106-115.
- Kroger, A. and M. Klingenberg. (1973). The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain. *Eur J Biochem*. 34(2): 358-368.

Kuffner, R., Rohr, A., Schmiede, A., Krull, C., and Schulte, U. (1998). Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol.* 283, 409-417.

Lamantea E, Carrara F, Mariotti C, Morandi L, Tiranti V, Zeviani M. (2002). A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscul Disord.* 12(1):49-52.

Lambert AJ, Brand MD. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.* 2004 Sep 17;279(38):39414-20.

Lange, C., and Hunte, C. (2002). Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 2800-2805.

Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quirós PM, Calvo E, Rodríguez-Hernández MA, Navas P, Cruz R, Carracedo Á, López-Otín C, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Fernández-Vizarra E, Enríquez JA. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science.* 28;340(6140):1567-70

Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2007). Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol Cell Biol.* 27, 4228-4237.

Lazarou, M., Smith, S.M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., and McKenzie, M. (2009). Assembly of nuclear DNA-encoded subunits into mitochondrial complex IV, and their preferential integration into supercomplex forms in patient mitochondria. *FEBS J.* 276, 6701-6713.

Leary, S.C., and Sasarman, F. (2009). Oxidative phosphorylation: synthesis of mitochondrially encoded proteins and assembly of individual structural subunits into functional holoenzyme complexes. *Methods Mol. Biol.* 554, 143-162.

Lee SJ, Yamashita E, Abe T, Fukumoto Y, Tsukihara T, Shinzawa-Itoh K, Ueda H, Yoshikawa S. (2001). Intermonomer interactions in dimer of bovine heart cytochrome c oxidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57(Pt 7):941-7.

- Lenaz G, Genova ML. (2009). Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(10):1750-1772.
- Lenaz G, Genova ML. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal.* 12:961–1008.
- Li Y, D'Aurelio M, Deng JH, Park JS, Manfredi G, Hu P, Lu J, Bai Y. (2007) An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria. *J Biol Chem.* 282: 17557–17562.
- Lombardi, A., Silvestri, E., Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., Goglia, F., de Lange, P., and Moreno, M. (2009). Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach. *J Proteomics.* 72, 708-721.
- Maklashina EO, Sled' VD, Vinogradov AD. (1994). Hysteresis behavior of complex I from bovine heart mitochondria: kinetic and thermodynamic parameters of retarded reverse transition from the inactive to active state. *Biokhimiia.* 59(7):946-57.
- Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML. (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal.* 1; 19 (13):1469-80.
- Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A., and Krause, F. (2007). Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryot Cell.* 6, 2391-2405.
- Martinez B, del Hoyo P, Martin MA, Arenas J, Perez-Castillo A, Santos A. (2001). Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *J Neurochem.* 78(5):1054-63.
- Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I, Mereghetti P, D'Adamo P, Gasparini P, Zeviani M. (2008). Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Am J Hum Genet.* 82(6):1281-9.

- McKenzie M, Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT. (2006). Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J Mol Biol.* 18;361(3):462-9.
- McKenzie, M., and Ryan, M.T. (2010). Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. *IUBMB Life.* 62(7), 497-502.
- Mick, D.U., Vukotic, M., Piechura, H., Meyer, H.E., Warscheid, B., Deckers, M., and Rehling, P. (2010). Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *J Cell Biol.* 191, 141-154.
- Mick, D.U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A.E., Perschil, I., Pawlas, M., Meyer, H.E., Warscheid, B., and Rehling, P. (2007). Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J* 26, 4347-4358.
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta.* 1817, 851-862.
- Minauro-Sanmiguel, F., S. Wilkens and J. J. Garcia (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(35): 12356-12358.
- Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 62, 327-367.
- Moran, M., Rivera, H., Sanchez-Arago, M., Blazquez, A., Merinero, B., Ugalde, C., Arenas, J., Cuezva, J.M., and Martin, M.A. (2010). Mitochondrial bioenergetics and dynamics interplay in complex I-deficient fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1802, 443-453.
- Moreno-Lastres D, Fontanesi F, García-Consuegra I, Martín MA, Arenas J, Barrientos A, Ugalde C. (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab.* 7;15(3):324-35.
- Muster, B., Kohl, W., Wittig, I., Strecker, V., Joos, F., Haase, W., Bereiter-Hahn, J., and Busch, K. (2010). Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells. *PLoS ONE.* 5, e11910. 10.1371/ journal.pone.0011910.

- Nakai, M., Endo, T., Hase, T., Tanaka, Y., Trumpower, B.L., Ishiwatari, H., Asada, A., Bogaki, M., and Matsubara, H. (1993). Acidic regions of cytochrome c1 are essential for ubiquinol-cytochrome c reductase activity in yeast cells lacking the acidic QCR6 protein. *J Biochem.* 114, 919-925.
- Nijtmans LG, Taanman JW, Muijsers AO, Speijer D, Van den Bogert C. (1998). Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem.* 1;254(2):389-94.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., and Holt, I.J. (2002). Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods.* 26, 327-334.
- Nobrega, F.G., and Tzagoloff, A. (1980). Assembly of the mitochondrial membrane system. Complete restriction map of the cytochrome b region of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. *J Biol Chem.* 255, 9821-9827.
- Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., and Tzagoloff, A. (1992). BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 11, 3821-3829.
- Nübel E, Wittig I, Kerscher S, Brandt U, Schägger H. (2009). Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*. *Proteomics.* 9(9):2408-18.
- Ogilvie, I., Kennaway, N.G., and Shoubbridge, E.A. (2005). A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest.* 115, 2784-2792.
- Oswald C, Krause-Buchholz U, Rödel G. (2009). Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase. *J Mol Biol.* 12;389 (3):470-9.
- Owusu-Ansah E, Yavari A, Mandal S, Banerjee U. (2008). Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat Genet.* 40(3):356-61.
- Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. (1953). *J Histochem Cytochem.* 1(4):188-211.

- Pallotti, F., Baracca, A., Hernandez-Rosa, E., Walker, W.F., Solaini, G., Lenaz, G., Melzi D'Eril, G.V., Dimauro, S., Schon, E.A., and Davidson, M.M. (2004). Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *The Biochemical journal*. 384, 287-293.
- Pello, R., Martin, M.A., Carelli, V., Nijtmans, L.G., Achilli, A., Pala, M., Torroni, A., Gomez-Duran, A., Ruiz-Pesini, E., Martinuzzi, A., et al. (2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum. Mol. Genet.* 17, 4001–4011.
- Perales-Clemente, E., Fernandez-Vizarra, E., Acin-Perez, R., Movilla, N., Bayona-Bafaluy, M.P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2010). Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly. *Mol Cell Biol.* 30, 3038-3047.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S.A., and Fox, T.D. (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22, 5951-5961.
- Pineau B, Mathieu C, Gérard-Hirne C, De Paepe R, Chétrit P. (2005). Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana glauca* CMS II mutant lacking nad7. *J Biol Chem.* 280(28):25994-6001.
- Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Green DR. Mitochondria, apoptosis and autoimmunity. (2006). *Curr Dir Autoimmun.* 9:55-73.
- Quarato, G., Piccoli, C., Scrima, R., and Capitanio, N. (2011). Variation of flux control coefficient of cytochrome c oxidase and of the other respiratory chain complexes at different values of protonmotive force occurs by a threshold mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807, 1114–1124.
- Ragan, C.I., and Heron, C. (1978). The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association. *Biochem J.* 174, 783-790.
- Ramirez-Aguilar, S. J., Keuthe, M., Rocha, M., Fedyaev, V. V., Kramp, K., Gupta, K. J., et al. (2011). The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability. *The Journal of Biological Chemistry.* 286, 43045–43053.

- Reichert AS, Neupert W. (2004). Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends Genet.* 20(11):555-62.
- Reid, R.A., Moyle, J., and Mitchell, P. (1966). Synthesis of adenosine triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria. *Nature.* 212, 257-258.
- Reifschneider, N.H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A., and Krause, F. (2006). Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE. *J Proteome Res.* 5, 1117-1132.
- Saada, A., Edvardson, S., Shaag, A., Chung, W.K., Segel, R., Miller, C., Jalas, C., and Elpeleg, O. (2012). Combined OXPHOS complex I and IV defect, due to mutated complex I assembly factor C20ORF7. *J Inherit Metab Dis.* 35, 125-131.
- Saada, A., Vogel, R.O., Hoefs, S.J., van den Brand, M.A., Wessels, H.J., Willems, P.H., Venselaar, H., Shaag, A., Barghuti, F., Reish, O., et al. (2009). Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet.* 84, 718-727.
- Salach, J., Tisdale, H.D., Singer, T.P., and Bader, P. (1967). Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase from mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 143, 281-284.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez E, Lobo T, Fox JL, Zeviani M, Winge DR, Fernández-Vizarra E. (2013). LYRM7/MZM1L is a UQCRC1 chaperone involved in the last steps of mitochondrial Complex III assembly in human cells. *Biochim Biophys Acta.* 1827(3):285-93.
- Saracco SA, Fox TD. (2002). Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol Biol Cell.* 13(4):1122-31.

- Sazanov, L.A., Carroll, J., Holt, P., Toime, L., and Fearnley, I.M. (2003). A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.* 278, 19483-19491.
- Sazanov, L.A., and Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science.* 311, 1430-1436.
- Schafer, E., H. Seelert, N. H. Reifschneider, F. Krause, N. A. Dencher and J. Vonck (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* 281(22): 15370-15375.
- Schäfer E, Dencher NA, Vonck J, Parcej DN. (2007). Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I₁III₂IV₁ from bovine heart mitochondria. *Biochemistry.* Nov 6;46 (44):12579-85.
- Schagger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1555, 154-159.
- Schagger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., and Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 279, 36349-36353.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777-1783.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* 276, 37861-37867.
- Smith, P.M., Fox, J.L., and Winge, D.R. (2012). Biogenesis of the cytochrome bc(1) complex and role of assembly factors. *Biochim Biophys Acta.* 1817, 276-286.
- Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, Green DR. (2005). Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science.* 7;310(5745):66-7.

- Sone, N., Sekimachi, M., and Kutoh, E. (1987). Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a bc₁ complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3. *J Biol Chem.* 262, 15386-15391.
- Sousa, P.M., Silva, S.T., Hood, B.L., Charro, N., Carita, J.N., Vaz, F., Penque, D., Conrads, T.P., and Melo, A.M. (2011). Supramolecular organizations in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Biochimie.* 93, 418-425.
- Stiburek L, Vesela K, Hansikova H, Pecina P, Tesarova M, Cerna L, Houstek J, Zeman J. (2005). issue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem J.* 15;392(Pt 3):625-32.
- Stiburek, L., Hansikova, H., Tesarova, M., Cerna, L., and Zeman, J. (2006). Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res* 55 Suppl 2, S27-41.
- Strogolova V, Furness A, Robb-McGrath M, Garlich J, Stuart RA. (2012). Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc₁-cytochrome c oxidase supercomplex. *Mol Cell Biol.* 32(8):1363-73.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schagger, H. (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.* 279, 5000-5007.
- Suissa S, Wang Z, Poole J, Wittkopp S, Feder J, et al. (2009) Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet.* 5: e1000474.
- Sun F, Huo X, Zhai Y et al (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell.* 121:1043–1057
- Sugiana, C., Pagliarini, D.J., McKenzie, M., Kirby, D.M., Salemi, R., Abu-Amero, K.K., Dahl, H.H., Hutchison, W.M., Vascotto, K.A., Smith, S.M., et al. (2008). Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet.* 83, 468-478.

- Suthammarak W, Yang YY, Morgan PG, Sedensky MM. (2009). Complex I function is defective in complex IV-deficient *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2009 Mar 6;284(10):6425-35.
- Swerdlow RH. (2007). Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrialopathies. *J Neurosci Res*. 15;85(15):3416-28.
- Szklarczyk, R., Wanschers, B.F., Nabuurs, S.B., Nouws, J., Nijtmans, L.G., and Huynen, M.A. (2011). NDUFB7 and NDUFA8 are located at the intermembrane surface of complex I. *FEBS Lett*. 585, 737-743.
- Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6, 389-402.
- Tordi, M.G., Silvestrini, M.C., Adzamli, K., and Brunori, M. (1987). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c551 and cytochrome oxidase oxidation by Co(phen)₃(3+) and Mn(CyDTA)(H₂O). *J Inorg Biochem*. 30, 155-166.
- Trounce I, Neill S, Wallace DC. (1994). Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T-->G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30;91 (18):8334-8.
- Trumpower, B.L. (1990). Cytochrome bc₁ complexes of microorganisms. *Microbiol Rev*. 54, 101-129.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 269, 1069-1074.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 24;272(5265):1136-44.
- Tzagoloff, A. (1995). Ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*. 260, 51-63.

- Tzagoloff A, Jang J, Glerum M, Wu M. (1996). FLX1 codes for a carrier protein involved in maintaining a proper balance of flavin nucleotides in yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 271:7392–7397.
- Ugalde, C., Janssen, R.J., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A., and Nijtmans, L.G. (2004). Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet.* 13, 659-667.
- Ugalde C, Hinttala R, Timal S, Smeets R, Rodenburg RJ, Uusimaa J, van Heuvel LP, Nijtmans LG, Majamaa K, Smeitink JA. (2007). Mutated ND2 impairs mitochondrial complex I assembly and leads to Leigh syndrome. *Mol Genet Metab.* 90(1):10-4.
- Van den Bogert C, Dontje BH, Melis TE, van der Veen C, Kroon AM. (1988). Inhibition of mitochondrial protein synthesis influences the glucocorticoid sensitivity of lymphoid cells. *Biochim Biophys Acta.* 9;972 (3):302-10.
- Van Nederveen FH, Gaal J, Favier J et al .(2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.* 10:764–771.
- Vempati UD, Han X, Moraes CT. (2009). Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem.* 13;284(7):4383-91.
- Vergani, L., Martinuzzi, A., Carelli, V., Cortelli, P., Montagna, P., Schievano, G., Carozzo, R., Angelini, C., and Lugaresi, E. (1995). MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 210,880-888.
- Vinogradov AD. (1998). Catalytic properties of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) and the pseudo-reversible active/inactive enzyme transition. *Biochim Biophys Acta.* 1364(2):169-85.
- Vives-Bauza, C., Gonzalo, R., Manfredi, G., Garcia-Arumi, E., and Andreu, A.L. (2006). Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. *Neuroscience letters.* 391, 136-141.

- Vogel, R.O., Dieteren, C.E., van den Heuvel, L.P., Willems, P.H., Smeitink, J.A., Koopman, W.J., and Nijtmans, L.G. (2007a). Identification of mitochondrial complex I assembly intermediates by tracing tagged NDUF53 demonstrates the entry point of mitochondrial subunits. *J Biol Chem.* 282, 7582-7590.
- Vogel, R.O., Janssen, R.J., van den Brand, M.A., Dieteren, C.E., Verkaart, S., Koopman, W.J., Willems, P.H., Pluk, W., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A., et al. (2007b). Cytosolic signaling protein Ecsit also localizes to mitochondria where it interacts with chaperone NDUF4B and functions in complex I assembly. *Genes Dev.* 21, 615-624.
- Vogel, R.O., Smeitink, J.A., and Nijtmans, L.G. (2007c). Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta.* 1767, 1215-1227.
- Vonck J, Schäfer E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1793(1):117-24.
- Vukotic M, Oeljeklaus S, Wiese S, Vögtle FN, Meisinger C, Meyer HE, Ziesenis A, Katschinski DM, Jans DC, Jakobs S, Warscheid B, Rehling P, Deckers M. (2012). Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab.* 7;15(3):336-47.
- Wagener, N., Ackermann, M., Funes, S., and Neupert, W. (2011). A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Mol Cell.* 44, 191-202.
- Wagener N, Neupert W. (2012). Bcs1, a AAA protein of the mitochondria with a role in the biogenesis of the respiratory chain. *J Struct Biol.* 179(2):121-5.
- Williams SL, Valnot I, Rustin P, Taanman JW. (2004). Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem.* 279(9):7462-9.
- Wittig I, Karas M, Schagger H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics.* 6(7):1215-25.
- Wittig I, Schagger H. (2009). Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1787(6):672-80.

- Wernicke, C., Hellmann, J., Zieba, B., Kuter, K., Ossowska, K., Frenzel, M., Dencher, N.A., and Rommelspacher, H. (2010). 9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacol Rep.* 62, 35-53.
- Wielburski, A., and Nelson, B.D. (1983). Evidence for the sequential assembly of cytochrome oxidase subunits in rat liver mitochondria. *Biochem J.* 212, 829-834.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science.* 277, 60-66.
- Yadava, N., Houchens, T., Potluri, P., and Scheffler, I.E. (2004). Development and characterization of a conditional mitochondrial complex I assembly system. *The Journal of biological chemistry.* 279, 12406-12413.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., and Tsukihara, T. (1998). Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *J Bioenerg Biomembr.* 30, 7-14.
- Zara, V., Palmisano, I., Conte, L., and Trumpower, B.L. (2004). Further insights into the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex based on analysis of single and double deletion mutants lacking supernumerary subunits and cytochrome b. *Eur J Biochem.* 271, 1209-1218.
- Zara V, Conte L, Trumpower BL. (2007). Identification and characterization of cytochrome bc(1) subcomplexes in mitochondria from yeast with single and double deletions of genes encoding cytochrome bc(1) subunits. *FEBS J.* 274(17):4526-39.
- Zara, V., Conte, L., and Trumpower, B.L. (2009). Evidence that the assembly of the yeast cytochrome bc1 complex involves the formation of a large core structure in the inner mitochondrial membrane. 276, 1900-1914.
- Zhang M, Mileyskoykaya E, Dowhan W. (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 15;277(46):43553-6.

Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 19;280 (33):29403-8.

Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., and Kim, S.H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature.* 392, 677-684.

Zhen, Y., Hoganson, C.W., Babcock, G.T., and Ferguson-Miller, S. (1999). Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase. I. Biochemical, spectral, and kinetic characterization of surface mutants in subunit ii of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome aa(3). *J Biol Chem.* 274, 38032-38041.

Zurita Rendon, O., and Shoubridge, E.A. (2012). Early complex I assembly defects result in rapid turnover of the ND1 subunit. *Hum Mol Genet.* 21, 3815-3824.

ANEXOS

TABLA RESUMEN DE LAS SUBUNIDADES DEL SISTEMA OXPHOS

| | | Subunidad | Módulo | Gen | Cromosoma | P.M |
|------------|-------------------|-----------|--------|---------|------------|----------|
| Complejo I | Brazo periférico | NDUFV1 | N | NDUFV1 | 11q13 | 50,8 kDa |
| | | NDUFV2 | N | NDUFV2 | 18p11.22 | 27,4 kDa |
| | | NDUFV3 | N | NDUFV3 | 21q22.3 | 11,9 kDa |
| | | NDUFS1 | N | NDUFS1 | 2q33-q34 | 79,5 kDa |
| | | NDUFS2 | Q | NDUFS2 | 1q23 | 52,5 kDa |
| | | NDUFS3 | Q | NDUFS3 | 11p11.11 | 30,2 kDa |
| | | NDUFS4 | Q | NDUFS4 | 5q11.1 | 20,1 kDa |
| | | NDUFS6 | Q | NDUFS6 | 5p15.33 | 13,7 kDa |
| | | NDUFS7 | Q | NDUFS7 | 19p13.3 | 23,5 kDa |
| | | NDUFS8 | Q | NDUFS8 | 11q13 | 23,7 kDa |
| | | NDUFA2 | Q | NDUFA2 | 5q31.2 | 10,9 kDa |
| | | NDUFA5 | Q | NDUFA5 | 7q31.33 | 13,5 kDa |
| | | NDUFA7 | Q | NDUFA7 | 19p13.2 | 12,5 kDa |
| | Brazo de membrana | NDUFA11 | Q | NDUFA11 | 19p13.3 | 14,9 kDa |
| | | NDUFA12 | Q | NDUFA12 | 12q22 | 17,1 kDa |
| | | NDUFA13 | Q | NDUFA13 | 19p13.2 | 16,7 kDa |
| | | NDUFA10 | P | NDUFA10 | 2q37.3 | 40,7 kDa |
| | | NDAFA9 | P | NDUFA9 | 12p13.3 | 42,5 kDa |
| | | ND1 | P | MT-ND1 | ADNmt | 35,7 kDa |
| | | ND2 | P | MT-ND2 | ADNmt | 38,9 kDa |
| | | ND3 | P | MT-ND3 | ADNmt | 13,2 kDa |
| | | ND4L | P | MT-ND4L | ADNmt | 10,7 kDa |
| | | NDUFC1 | P | NDUFC1 | 4q31.1 | 8,7 kDa |
| | | NDUFA1 | P | NDUFA1 | Xq24 | 8,1 kDa |
| | | NDUFA3 | P | NDUFA3 | 19q13.42 | 9,3 kDa |
| | | NDUFA6 | P | NDUFA6 | 22q13.2 | 17,9 kDa |
| | | NDUFA8 | P | NDUFA8 | 9q33.2 | 20,1 kDa |
| | | NDUFS5 | P | NDUFS5 | 1p34.2-p33 | 12,5 kDa |
| | | ND6 | P | MT-ND6 | ADNmt | 18,6 kDa |
| | | NDUFB4 | P | NDUFB4 | 3q13.33 | 15,2 kDa |
| | | NDUFAB1 | P | NDUFAB1 | 16p12.2 | 17,4 kDa |
| | | NDUFB1 | P | NDUFB1 | 14q32.12 | 6,9 kDa |
| | | NDUFB2 | P | NDUFB2 | 7q34 | 12,1 kDa |
| | | NDUFB3 | P | NDUFB3 | 2q31.3 | 11,4 kDa |
| | | NDUFB5 | P | NDUFB5 | 3q26.33 | 21,7 kDa |
| | | NDUFB6 | P | NDUFB6 | 9p21.1 | 15,5 kDa |
| | | NDUFB7 | P | NDUFB7 | 19p13.12 | 16,4 kDa |
| | | NDUFB8 | P | NDUFB8 | 10q24.31 | 21,7 kDa |
| | | NDUFB9 | P | NDUFB9 | 8q13.3 | 21,8 kDa |
| | | NDUF10 | P | NDUF10 | 16p13.3 | 20,7 kDa |
| | | NDUFB11 | P | NDUFB11 | Xp11.23 | 17,3 kDa |
| | | NDUFC2 | P | NDUFC2 | 11q14.1 | 14,2 kDa |
| | | ND4 | P | MT-ND4 | ADNmt | 51,6 kDa |
| | | ND5 | P | MT-ND5 | ADNmt | 67 kDa |

| | | Subunidad | Localización | Gen | Cromosoma | P.M |
|-------------|--|-----------|--------------|------|------------|----------|
| Complejo II | | SDHA | Soluble | SDHA | 5p15 | 72,7 kDa |
| | | SDHB | Soluble | SDHB | 1p36.1-p35 | 31,6 kDa |
| | | SDHC | Membrana | SDHC | 1q23.3 | 18,6 kDa |
| | | SDHD | Membrana | SDHD | 11q23 | 17 kDa |

| | | Subunidad | Localización | Gen | Cromosoma | P.M |
|--------------|--|---------------|--------------|---------|-----------|----------|
| Complejo III | | Citocromo b | Membrana | MT-CYB | ADNmt | 42,2 kDa |
| | | CORE I | Soluble | UQCRC1 | 3p21.3 | 52,4 kDa |
| | | CORE II | Soluble | UQCRC2 | 16p12 | 48,4 kDa |
| | | Citocromo c1 | Soluble | CYC1 | 8q24.3 | 35,4 kDa |
| | | RISP (Rieske) | Soluble | UQCRFS1 | 19q12 | 29,7 kDa |
| | | Subunit 6 | Soluble | UQCRH | 1p34.1 | 10,7 kDa |
| | | Subunit 7 | Soluble | UQCRB | 8q22 | 13,5 kDa |
| | | Subunit 8 | Soluble | UQCRQ | 5q31.1 | 9,9 kDa |
| | | Subunit 9 | Soluble | UQCR10 | 22q12.2 | 9,5 kDa |
| | | Subunit 10 | Soluble | UQCR11 | 19p13.3 | 6,6 kDa |
| | | Subunit 11 | Soluble | UQCRFS1 | 19q12 | 8 kDa |

| | | Subunidad | Localización | Gen | Cromosoma | P.M |
|-------------|--|-----------|--------------|--------|-----------|----------|
| Complejo IV | | COX I | Membrana | MT-CO1 | ADNmt | 57 kDa |
| | | COX II | Membrana | MT-CO2 | ADNmt | 25,6 kDa |
| | | COX III | Membrana | MT-CO3 | ADNmt | 29,9 kDa |
| | | COX IV | Soluble | COX4I1 | 16q24.1 | 19,6 kDa |
| | | COX IV | Soluble | COX4I2 | 20q11.21 | 20 kDa |
| | | COX Va | Soluble | COX5A | 15q24.1 | 16,8 kDa |
| | | COX Vb | Soluble | COX5B | 2cen-q13 | 1,7 kDa |
| | | COX VIa | Soluble | COX6A1 | 12q24.2 | 12,1 kDa |
| | | COX VIa | Soluble | COX6A2 | 16p11.12 | 10,8 kDa |
| | | COX VIb | Soluble | COX6B1 | 19q13.1 | 10,2 kDa |
| | | COX VIb | Soluble | COX6B2 | 19q13.42 | 10,5 kDa |
| | | COX VIc | Soluble | COX6C | 8q22.2 | 8,8 kDa |
| | | COX VIIa | Soluble | COX7A1 | 19q13.1 | 9,1 kDa |
| | | COX VIIb | Soluble | COX7B | Xq21.1 | 9,2 kDa |
| | | COX VIIc | Soluble | COX7C | 5q14 | 7,2 kDa |
| | | COX VIII | Soluble | COX8A | 11q12-q13 | 7,6 kDa |
| | | COX VIII | Soluble | COX8B | 14q32.12 | 8,1 kDa |
| | | NDUFA4 | | NDUFA4 | 7p21.3 | 9,3 kDa |

ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

1. FORMA PARTE DE LA TESIS:

Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. **Moreno-Lastres D**, Fontanesi F, García-Consuegra I, Martín MA, Arenas J, Barrientos A, Ugalde C. *Cell Metab.* 2012 Mar 7; 15(3):324-35.

2. PUBLICADO DURANTE ESTE PERIODO:

Impact of the mitochondrial genetic background in complex III deficiency. Gil Borlado MC*, **Moreno Lastres D***, González Hoyuela M, Moran M, Blázquez A, Pello R, Marín Buera L, Gabaldon T, García Peñas JJ, Martín MA, Arenas J, Ugalde C. *PLoS One.* 2010 Sep 17;5(9). (***Primera autoría compartida**)

Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration. Morán M, **Moreno-Lastres D**, Marín-Buera L, Arenas J, Martín MA, Ugalde C. *Free Radic Biol Med.* 2012 Aug 1; 53(3):595-609.

